DIE SYNTHESE VON
1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-ß-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Urs Marcel Séquin

von Basel und Thun (BE)

Basel 1970

Stuttgart 1970

P. Illg Offsetdruck

DIE SYNTHESE VON
1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-ß-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Urs Marcel Séquin
von Basel und Thun (BE)

Basel 1970

Stuttgart 1970
P. Illg Offsetdruck

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Genehmigt von der Philosophisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der

Herren Professoren Dr. Ch. Tamm
Dr. C.A. Grob

Basel, den 1.Dezember 1970

Prof. Dr. S. Fallab
Dekan

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546026_0007

Die vorliegende Arbeit wurde in den Laboratorien des Instituts für Organische Chemie der Universität Basel unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ch. Tamm ausgeführt.

Meinem Lehrer, Herrn Professor Tamm, danke ich herzlich für das grosse Interesse an der vorliegenden Arbeit und seine stete Bereitschaft, bei der Lösung chemischer wie auch persönlicher Probleme mitzuhelfen.

Darüberhinaus hat das herzliche Klima in seiner Arbeitsgruppe sicher wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen lieben Eltern und

meiner lieben Frau

in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A. THEORETISCHER TEIL 1

I. EINLEITUNG 1

II. SYNTHESE VON 1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-β--D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon 2

1. Problemstellung 2

2. Wahl der Base 3

3. Wahl des Syntheseweges 5

3.1. Bekannte Verfahren zur Synthese von Nucleosiden 5

3.1.1. Mit Polyphosphorsäureester 5

3.1.2. Reaktion in der Schmelze 6

3.1.3. Thioketalmethode 6

3.1.4. Hilbert-Johnson-Verfahren 7

3.1.5. Silyl-Verfahren 7

3.1.6. Fischer-Helferich-Verfahren 8

3.1.7. Quecksilber-Verfahren 9

3.2. Der gewählte Syntheseweg 11

4. Durchführung der Synthese 13

4.1. Die beiden di-O-toluylierten Nucleoside 14 und 15 13

4.1.1. Herstellung 13

4.1.2. Konstitutionsbeweis 15

4.1.3. Konfiguration an C-1' 17

4.1.3.1. Die "Triplett-Quartett-Regel" 17

4.1.3.2. NMR.-Spektren der Nucleoside 14 und 15 in $(CD_3)_2SO$ 19

Seite

4.1.3.3. NMR.-Spektren der Nucleoside 14 u. 15 in C_5D_5N 21

4.1.3.4. Die optischen Drehungen 22

4.2. Die beiden freien Nucleoside 20 und 21 22

4.2.1. 1-(2'-Desoxy-α-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (20) 22

4.2.1.1. Entfernen der Toluylgruppen mit NH_3 22

4.2.1.2. Entfernen der Toluylgruppen mit $NaOCH_3$ 23

4.2.2. 1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (21) 23

4.2.3. Konstitution der beiden freien Nucleoside 20 und 21 23

4.2.4. Konfiguration an C-1' 26

4.2.5. Biologische Aktivität 29

4.3. Das geschützte Nucleotid 22 29

4.3.1. Phosphorylierung des β-Nucleosids 21 29

4.3.2. Konstitution und Konfiguration 31

4.4. 2-Pyridon-β-nucleosid-5'-phosphat 25 32

4.4.1. Reduktion der Trichloräthylgruppen 32

4.4.2. Charakterisierung 33

4.4.3. Konstitution, Abbau mit Schlangengift 33

5. Bemerkungen zu den NMR.-Spektren der hergestellten Verbindungen 37

III. ANHANG. Versuche zur Festkörpersynthese ("Solid Phase Synthesis") von Oligonucleotiden 38

1. Allgemeines 38

1.1. Einleitung 38

Seite

1.2. Die verschiedenen Trägermaterialien 40

1.2.1. Lösliche Träger 40

1.2.2. Unlösliche Träger 40

1.3. Die Verknüpfung zwischen dem ersten Nucleosid und dem Träger 41

2. Eigene Versuche 43

2.1. Allgemeines 43

2.2. Popcornpolymeres mit Carbonsäurechloridgruppen 43

2.3. Popcormpolymeres mit Monomethoxytritylgruppen 44

2.4. Schlussbemerkungen 45

B. EXPERIMENTELLER TEIL 47

I. ALLGEMEINES 47

II. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE 48

1. 2-Hydroxypyridin-quecksilber(II)-monochlorid (18) 48

2. 3,5-Di-O-p-toluyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid (19) 48

3. Umsetzung von 3,5-Di-O-p-toluyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid (19) mit 2-Hydroxypyridin-quecksilber(II)-monochlorid (18) 49

3.1. Mit Zusatz von $HgBr_2$ 49

3.2. Ohne Zusatz von $HgBr_2$ 50

3.3. Charakterisierung der Produkte 51

4. 1-(2'-Desoxy-α-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (20) 54

Seite

4.1. Entfernen der Schutzgruppen mit Na-Methylat 55

4.2. Entfernen der Schutzgruppen mit NH_3 in Methanol 55

5. 1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (21) 57

6. Phosphorsäure-bis-[2,2,2-trichloräthylester]-chlorid (23) 58

7. 1-[5'-O-(Bis-[2,2,2-trichloräthyl]-phosphoryl)-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2(1H)-pyridon (22). 59

8. 1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (25) 62

8.1. Isolierung als Ba-Salz 62

8.2. Isolierung als Na-Salz 63

8.3. Isolierung als NH_4-Salz 64

9. Enzymatischer Abbau des Nucleotides 25 mit rohem Gift von Crotalus adamanteus 65

9.1. Stammlösung des Enzyms 65

9.2. Allgemeiner Ansatz 65

9.3. Abbau des 2-Pyridon-β-nucleosid-5'-phosphats (25) 65

III. DUENNSCHICHTCHROMATOGRAFIE 66

IV. ANHANG: Herstellung eines Popcornpolymeren mit Monomethoxy-tritylgruppen 68

1. Styrol-Divinylbenzol-Popcornpolymeres (31) 68

2. Benzophenon-Polymeres (32) 68

3. Methoxytrityl-carbinol-Polymeres (34) 70

4. Methoxytrityl-chlorid-Polymeres (35) 71

Seite

C. ZUSAMMENFASSUNG 72

D. LITERATURVERZEICHNIS 74

E. CURRICULUM VITAE 78

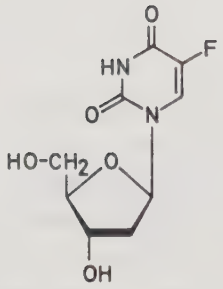
A. THEORETISCHER TEIL

I. EINLEITUNG

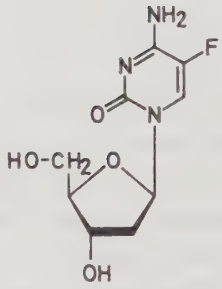
Die Erforschung der Nucleinsäuren und ihrer Komponenten gehört immer noch zu den aktuellsten und faszinierendsten Themen der Naturwissenschaften. Für den synthetisch interessierten Chemiker stehen gegenwärtig zwei Probleme im Vordergrund. Das eine betrifft die Verknüpfung einzelner Nucleotide in einer genau bestimmten Reihenfolge zu Polynucleotiden und zu Nucleinsäuren-Analogen [1] [2]. Zum andern werden in grosser Zahl modifizierte Nucleoside hergestellt [3] [4] [5]. Diese unterscheiden sich im Zucker- oder Basenteil von den natürlich vorkommenden Verbindungen.

Viele dieser neuen Substanzen sind biologisch aktiv, sei es, dass sie als Enzyminhibitoren wirken, das Wachstum von Bakterien beeinflussen, gegen Tumoren wirksam sind, oder dass sie in einer noch nicht erkannten Weise in die biochemischen Vorgänge in gewissen Organismen einzugreifen vermögen. Der Hinweis, dass 5-Fluor-2'-desoxy-uridin (1) und 5-Fluor-2'-desoxy--cytidin (2) eine Wirkung gegen experimentelle Tumoren zeigen, möge hier als Beispiel dienen [6]. Auch sind Nucleosidderivate bekannt geworden, die antivirale Eigenschaften besitzen oder immunologische Effekte zeigen [7]. Es liegt auf der Hand, zu hoffen, dass solche Verbindungen der Medizin neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

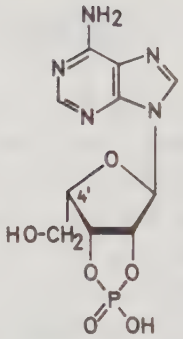
Künstliche Nucleoside werden auch als Modellsubstrate für Enzyme verwendet; sie ermöglichen das Studium der Mechanismen dieser Reaktionen. Holý und Šorm [8] haben z. B. mit Hilfe von 9-(α-L-Lyxofuranosyl)-adenin-2',3'-cyclophosphat (3) (unterscheidet sich vom entsprechenden Adenosinderivat nur



1



2



3

durch die Stereochemie am C-4') gezeigt, dass Ribonuclease T_1 die Stellung der Hydroxymethylgruppe an C-4' nicht erkennen kann.

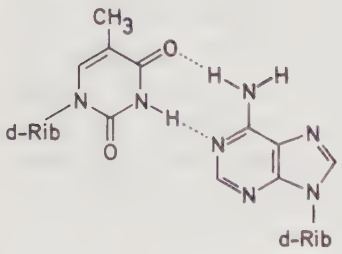
Oligonucleotide, die ein nicht natürliches Nucleotid enthalten, können wichtige Hilfsmittel sein zur Aufklärung der Mechanismen der Proteinbiosynthese und der dabei beteiligten Enzyme [9] [10].

II. SYNTHESE VON 1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon

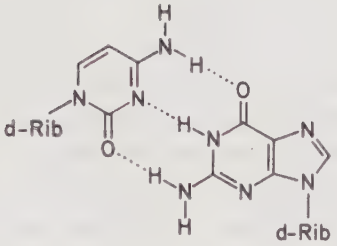
1. Problemstellung

Ein biologisches Funktionieren der Nucleoside in den Nucleinsäuren wäre undenkbar ohne die funktionellen Gruppen an der heterocyclischen Base: fehlen diese ganz oder teilweise, so ist das Ausbilden von komplementären Basenpaaren ge-

stört.



Thymin — Adenin



Cytosin — Guanin

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war nun, ein Nucleosid (und später das entsprechende Nucleotid) zu synthetisieren, das nicht mehr fähig ist, diese Basenpaarung einzugehen. Seine Struktur sollte aber möglichst ähnlich wie die der natürlichen Nucleoside sein, damit sich später bei seinem Einbau in ein Oligonucleotid die üblichen synthetischen Methoden, Schutzgruppen und Kondensationsmittel verwenden lassen.

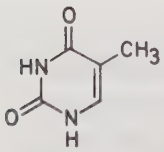
Ein Oligonucleotid mit einer solchen Fehlstelle könnte z. B. Aufschluss geben, zu welchen Folgen ein solches "Informationsloch" bei der Replication oder Transcription von Desoxyribonucleinsäure (DNA) führt.

2. Wahl der Base

Das Naheliegendste, um eine wirklich deutliche Fehlstelle in einem Oligonucleotid zu erhalten, wäre wohl der Einbau einer Desoxyribose ohne Base. Dies bietet jedoch insofern Schwierigkeiten, als dieser Zuckerrest dann nicht mehr in einer bestimmten Konfiguration vorliegen würde. Es läge ein Gemisch von offener Form und α- und β-Furanosid vor. (Die Pyranose-Form

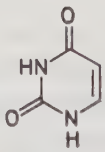
kommt, wenn die Desoxyribose einmal in die Kette eingebaut ist, nicht mehr in Frage, da ja die 5'-Hydroxylgruppe nicht mehr frei ist.) Die ganze Regelmässigkeit im Nucleotidstrang würde aber dadurch ohne Zweifel zu stark gestört. Damit sich das "falsche" Nucleosid möglichst gut einfügt und auch ungefähr die gleiche Stabilität (z. B. gegen Hydrolyse) wie die übrigen Nucleoside besitzt, sollte die zu wählende Base etwa die gleiche Raumerfüllung und den gleichen pK_a-Wert [1] wie z. B. Thymin (4) aufweisen.

2(1H)-Pyridon (= α-Pyridon)(5) schien für unsere Zwecke gut geeignet zu sein, wie der Vergleich mit den natürlichen Basen Thymin (4), Uracil (6) und Adenin (7) zeigte.



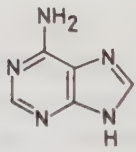
4

Thymin
$pK_a \approx 0$
[11]



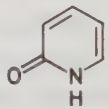
6

Uracil
$pK_a \approx 0{,}5$
[11]



7

Adenin
$pK_a < 1$
[12]



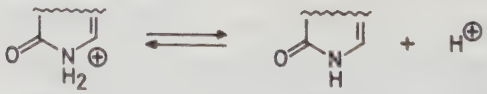
5

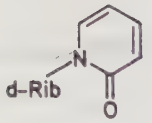
2(1H)-Pyridon
$pK_a = 0{,}75$
[13]

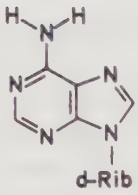
Die Bildung von Basenpaaren ist mit einem Pyridon-Nucleosid kaum mehr möglich:

---

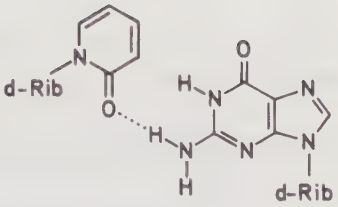
1) pK_a-Wert des Stickstoffs, der nachher mit dem Zuckerteil verbunden ist.







2-Pyridon — Adenin



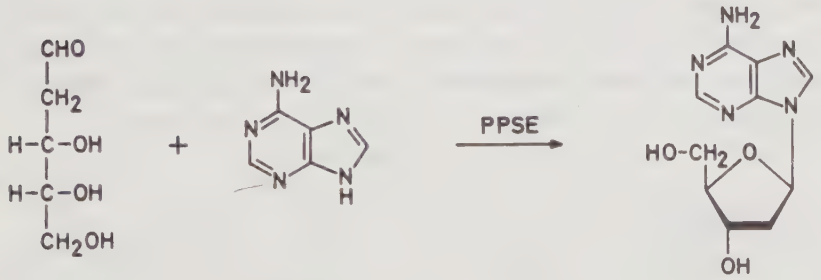
2-Pyridon — Guanin

3. Wahl des Syntheseweges

3.1. Bekannte Verfahren zur Synthese von Nucleosiden [2]

3.1.1. Mit Polyphosphorsäureester

Der ungeschützte Zucker wird mit der Base und Polyphosphorsäureester in Dimethylformamid erhitzt. Auf diese Weise konnte Desoxy-adenosin in 30-prozentiger Ausbeute erhalten werden [15].



Die Reproduzierbarkeit dieser Methode ist umstritten; ihr Er-

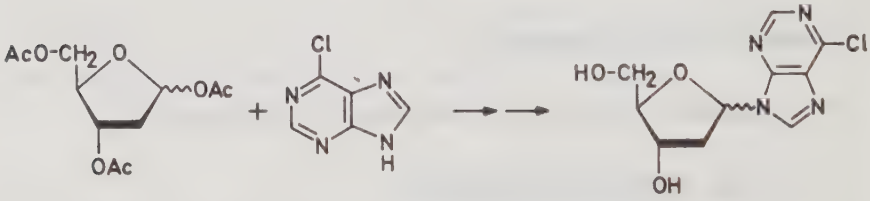
---

2) Vgl. auch die soeben erschienene Uebersicht von Zorbach [14].

folg scheint von der Qualität des verwendeten Polyphosphorsäureesters abzuhängen.

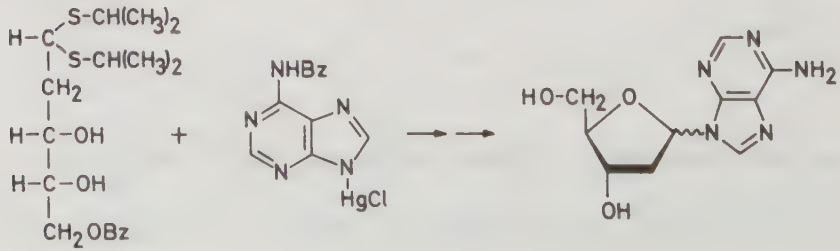
3.1.2. Reaktion in der Schmelze

Der vollständig acylierte Zucker wird mit der Base und einer katalytischen Menge Chloressigsäure zusammengeschmolzen; ein Gemisch der anomeren Nucleoside entsteht. Die Synthese von 6-Chlor-9-(2'-desoxy-D-ribofuranosyl)-purin durch Robins et al. [16] möge zur Illustration dienen.



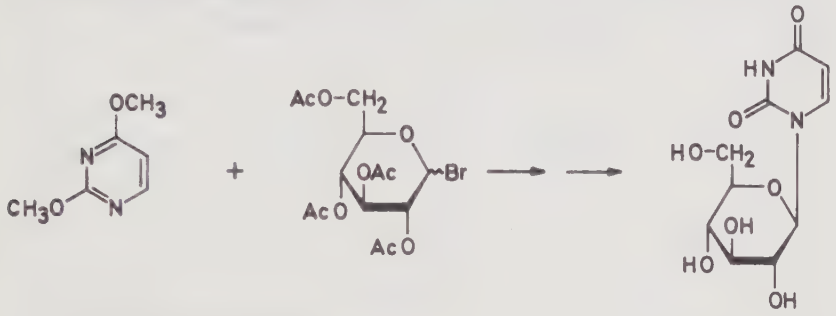
3.1.3. Thioketalmethode

Desoxyribose wird mit Isopropylthiol in das Mercaptal übergeführt und dieses bei -15° selektiv an der 5'-Hydroxylgruppe benzoyliert. Die erhaltene Verbindung wird mit einem Quecksilberderivat der Base in Acetonitril umgesetzt. Mit N-Benzoyladenin wurden auf diese Weise 14 % des Gemisches der beiden anomeren Nucleoside erhalten [17] .



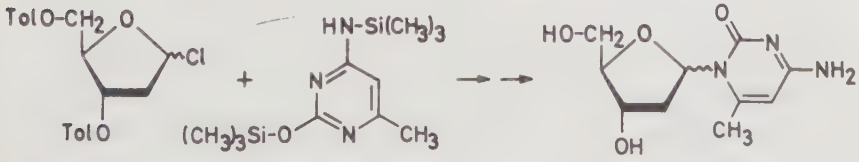
3.1.4. Hilbert-Johnson-Verfahren

Beim Hilbert-Johnson-Verfahren [18] wird ein acyliertes Zuckerhalogenid mit einem O-alkylierten oder O-acylierten Pyrimidinderivat umgesetzt. Das Glucosid des Uracils ist z. B. wie folgt erhalten worden [19]:



3.1.5. Silyl-Verfahren

Beim Silyl-Verfahren handelt es sich um einen modifizierten Hilbert-Johnson-Prozess. Die aus Pyrimidin-Base und Hexamethyl-disilazan hergestellte Silylverbindung wird mit der acylierten Halogenose umgesetzt. Die Reaktion erfolgt bei Zimmertemperatur in Acetonitril unter Zusatz von Molekularsieb [20].

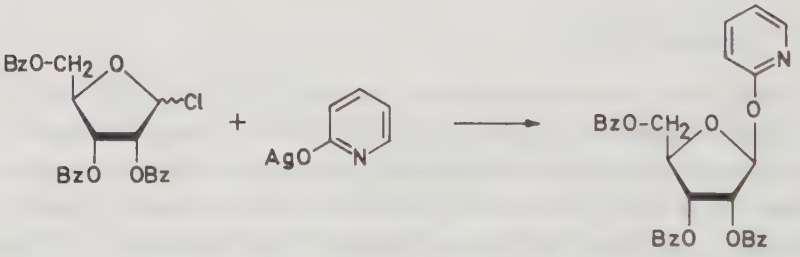


3.1.6. Fischer-Helferich-Verfahren

Nach dieser Methode wird das Silbersalz der Base mit der acylierten Halogenose in siedendem Xylol, Toluol oder Benzol umgesetzt. Die Salze der Purine führen direkt zu den N-Glykosiden [21], diejenigen der Pyrimidine und verwandter Verbindungen mit Lactam-Lactim-Tautomerie zu O-Glykosiden [22].

[23] [24]

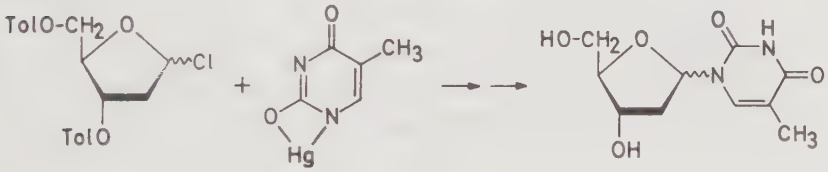
Als Beispiel ist hier die Synthese des Ribose-O-Glykosids von 2-Pyridon angegeben [22].



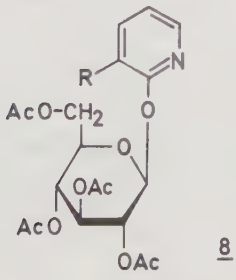
Die entsprechenden N-Glykoside erhält man aus den acylierten O-Glykosiden durch Erhitzen mit $HgBr_2$ in einem unpolaren Lösungsmittel wie Xylol oder Toluol. Auf diese O→N-Umglykosidierung wird beim Quecksilber-Verfahren (siehe unten) noch näher eingegangen.

3.1.7. Quecksilber-Verfahren

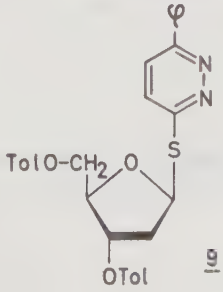
Beim Quecksilber-Verfahren handelt es sich um eine Variante der Fischer-Helferich-Methode. Anstelle der Silbersalze werden hier Quecksilberverbindungen der Basen mit der acylierten Halogenose umgesetzt. Dabei werden entweder Hg-Komplexe mit dem Verhältnis Base : Hg wie 1 : 1 [6] und 2 : 1 [25] oder Quecksilber(II)-monochlorid-salze der Base verwendet [26]. Purine ergeben auf diese Weise direkt die Nucleoside [27]. Aus den Pyrimidinderivaten und anderen Verbindungen, bei welchen die Lactam-Lactim-Tautomerie möglich ist, bilden sich zuerst die O-Glykoside; dabei wird Hg(II)-Halogenid frei. Dieses bewirkt nun in situ eine O→N-Umglykosidierung zu den Nucleosiden [28]. Die Synthese von α- und β-Thymidin durch Hoffer [29] sei hier als Beispiel angeführt.



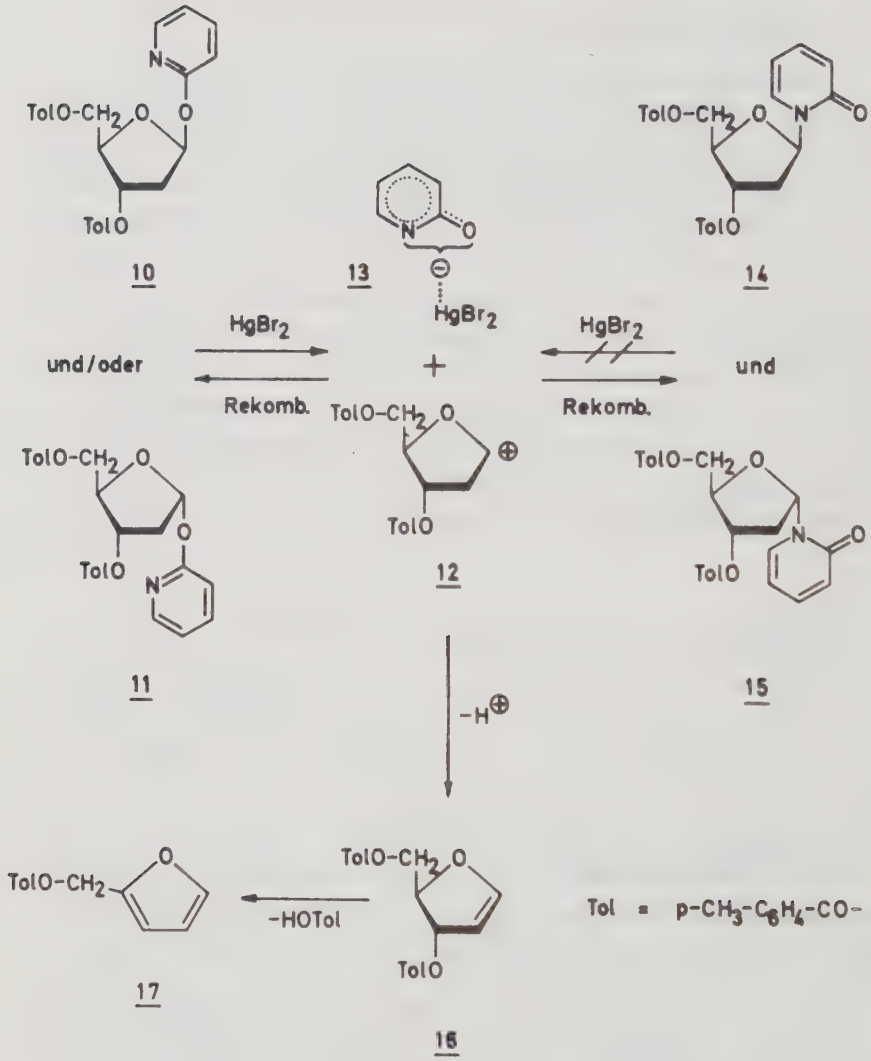
Wagner und Mitarbeiter haben diese O→N-Umglykosidierung an vielen Beispielen untersucht. In Analogie zu den von ihnen vorgeschlagenen Mechanismen dieser Reaktion bei den Glukosiden von 2-Pyridonen (8) [30] [31] und der S→N-Umlagerung von



8



9



Formelschema 1: Mechanismus der O→N-Umglykosidierung.

Desoxyribofuranosiden des 3-Mercapto-6-phenyl-pyridazins (9) [32] dürfte im Falle der Desoxyribofuranoside des 2-Pyridons folgende Beschreibung zutreffen (vgl. Formelschema 1; die 3'- und 5'-Hydroxyle sind durch den Toluylrest, p-CH_3-C_6H_4-CO- , geschützt):

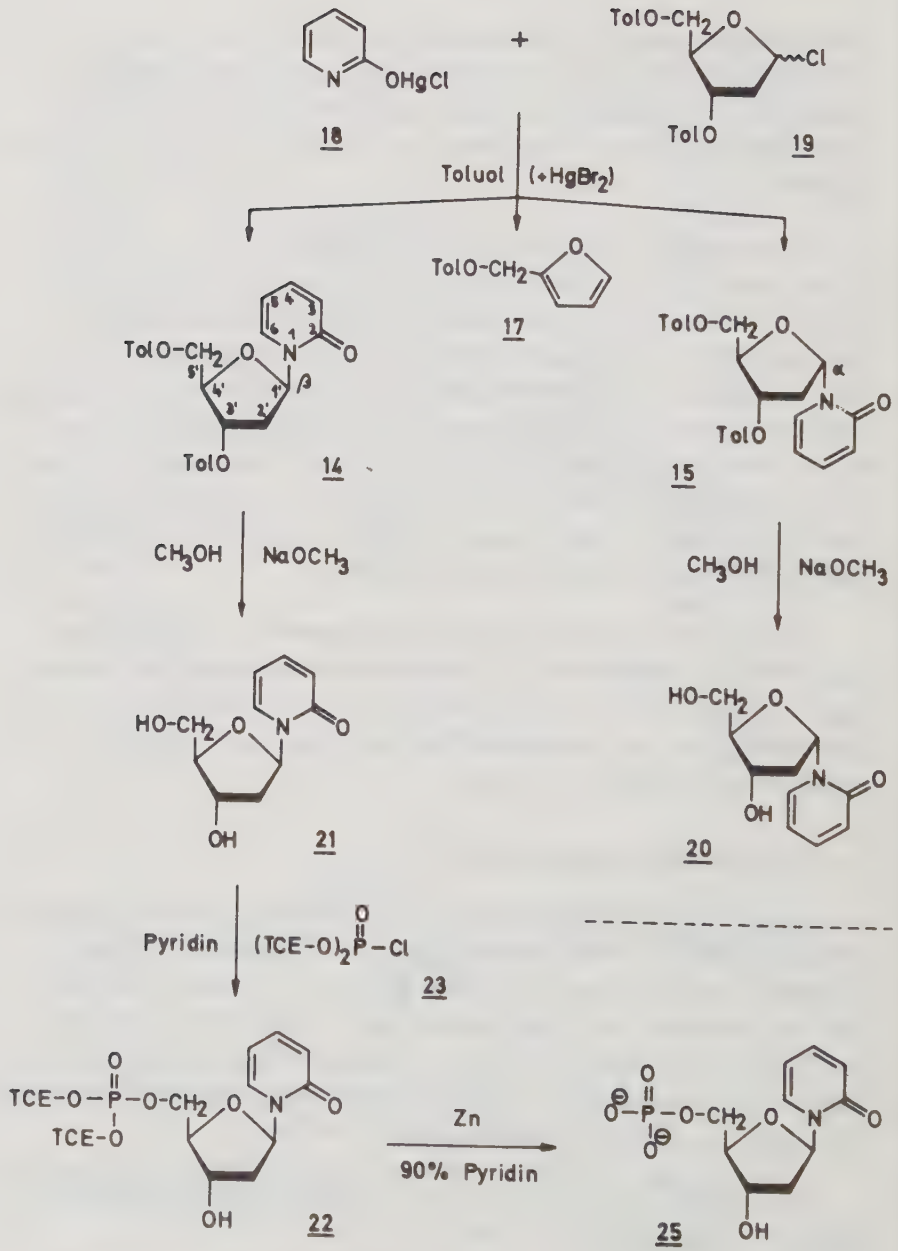
Unter Einwirkung der Lewis-Säure $HgBr_2$ wird die glykosidische Bindung der säurelabilen O-Glykoside 10 und 11 aufgespalten. Es entstehen das toluylierte Desoxy-ribofuranosyl--Kation (12) und das durch $HgBr_2$ stabilisierte, mesomere Anion des 2-Pyridons (13). Die Rekombination dieser Ionen führt zu vier Produkten: zu den anomeren O-Glykosiden (10 und 11) und den anomeren N-Glykosiden 14 und 15. Diese sind wesentlich stabiler gegenüber Säuren als die O-Glykoside und reichern sich deshalb im Gemisch immer mehr an, während die O-Glykoside erneut in die Umsetzung einbezogen werden.

Die in dieser Reaktion auch vorhandenen freien Anionen des Pyridons vermögen am C-2 des Desoxy-ribofuranosyl-Kations (12) ein Proton zu entfernen; das entstehende unstabile Dihydrofuranderivat 16 eliminiert dann p-Toluylsäure und geht in Furfuryl-p-toluylat (17) über.

3.2. Der gewählte Syntheseweg

Das Polyphosphorsäureester- wie auch das Schmelzverfahren schienen uns zu kleine Ausbeuten und zu viele Nebenprodukte zu geben. Die Synthesen nach der Thioketal-, Hilbert-Johnson- und Silylmethode benötigen aufwendigere Zwischenprodukte als das Fischer-Helferich-Verfahren und dessen Quecksilber-Modifikation. Da beim α-Pyridon eine Lactam-Lactim-Tautomerie möglich ist, fiel das Fischer-Helferich-Verfahren weg.

Wir entschlossen uns also für das Quecksilber-Verfahren; weitere Argumente dafür waren:



Formelschema 2: Syntheseweg.

Tol = p-CH_3-C_6H_4-CO- TCE = CCl_3-CH_2-

(1) Das herzustellende Nucleosid 14 kann wohl am ehesten mit Thymidin, dem einfachsten natürlichen Nucleosid, verglichen werden. Die beiden anomeren Thymidine wurden vor einigen Jahren von Hoffer [29] nach dem Quecksilber-Verfahren hergestellt. (2) Eine japanische Arbeitsgruppe [26] hatte das Ribosid des 2-Pyridons nach dieser Methode hergestellt. (3) Die benötigten Zwischenprodukte, 2-Hydroxy-pyridin-quecksilber(II)-monochlorid (18) (siehe Formelschema 2) und 3,5-Di-O-p-toluyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid (19) wären leicht zugänglich.

4. Durchführung der Synthese

4.1. Die beiden di-O-toluylierten Nucleoside 14 und 15

4.1.1. Herstellung

Das durch Umsatz von 2-Pyridon und $HgCl_2$ in alkalischer Lösung erhaltene 2-Hydroxypyridin-quecksilber(II)-monochlorid (18) [26] wurde mit etwas weniger als einem Aequivalent 3,5-Di-O-p-toluyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid (19) [29] in Toluol am Rückfluss gekocht. Nach drei Stunden wurde, um die eventuell noch vorhandenen O-Glykoside in die Nucleoside überzuführen, $HgBr_2$ zugesetzt und weitere vier Stunden bei Siedehitze gehalten [28].

Die chromatografische Trennung des Rohproduktes an einer Kieselgelsäule ergab drei Substanzen. Die zuerst eluierte, Furfuryl-p-toluylat (17), konnte durch Vergleich mit einer Probe, die durch Veresterung von Furfurylalkohol mit p-Toluylchlorid erhalten wurde, identifiziert werden (vgl. Exper. Teil). Es handelte sich dabei um das Zersetzungsprodukt der Halogenose 19. Diese Zersetzung wurde schon von Prystaš et al. [33] [34] und kürzlich auch von Heller und Wagner [32] beschrieben.[3)]

3) vgl. auch Hinweis beim Mechansismus der O→N-Umglykosidierung.

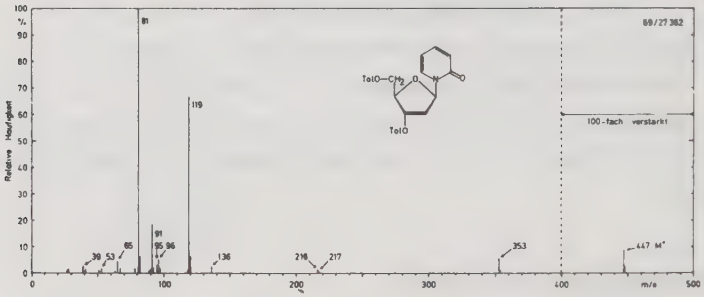


Fig. 1: Massenspektrum des β-Nucleosids 14.

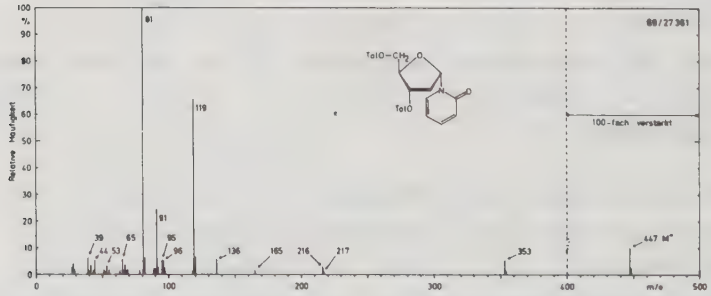


Fig. 2: Massenspektrum des α-Nucleosids 15.

Die beiden anderen Verbindungen zeigten praktisch gleiche IR.-, UV.- und Massenspektren. Sie unterschieden sich nur bezüglich Schmelzpunkt, optischer Drehung und NMR.-Spektrum. Dies liess vermuten, dass es sich um die beiden gesuchten anomeren Nucleoside 14 und 15 des 2-Pyridons handelte. Diese Vermutung erwies sich, wie weiter unten gezeigt wird, als richtig.

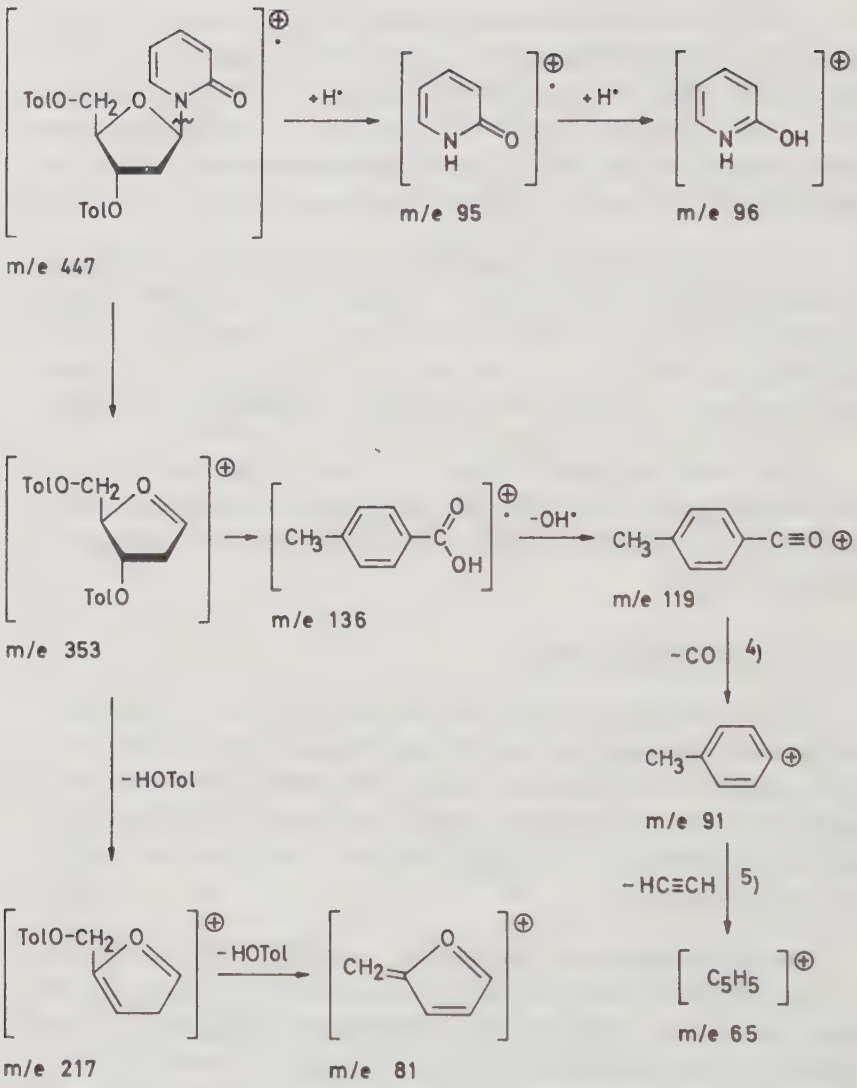
Die Ausbeuten an Nucleosid waren relativ klein. Das β-Nucleosid 14, Smp. 113,5 - 115,5°, wurde zu 12,3 % (nach Chromatografie) bzw. zu 8 % (nach Kristallisation) erhalten, das α-Anomere 15, Smp. 157 - 158°, zu 9,8 % bzw. 7,3 %. Wir führten dies auf die starke Zersetzung der Halogenose 19 zurück.

Bei einem weiteren Versuch, der ohne Zusatz von $HgBr_2$ durchgeführt wurde, konnten die Ausbeuten an kristallinen Nucleosiden auf 27 % für das β- und 21 % für das α-Anomere gesteigert werden.

4.1.2. Konstitutionsbeweis

Die Schwingung im IR.-Spektrum bei 1660 cm^{-1} sowie das Maximum im UV.-Spektrum bei 302 nm zeigen, dass die Verknüpfung zwischen der Desoxyribose und der Base N-glykosidisch sein muss. Bei O-Glykosiden fehlt diese Bande im IR., und das Absorptionsmaximum im UV. liegt wie bei O-alkyliertem 2-Pyridon bei 272 nm [35].

Die Massenspektren (vgl. Fig. 1 und Fig. 2) zeigen, dass die beiden di-O-toluylierten Nucleoside unter Elektronenstoss ganz ähnlich wie Desoxyuridin fragmentieren [36] (vgl. Formelschema 3). Das Molekel-Ion (m/e 447) zerfällt zuerst in einen Zucker- und einen Basenteil, wobei entweder dieser oder der Zuckerteil die Ladung trägt. Das geladene Zuckerfragment (m/e 353) zerfällt weiter unter schrittweiser Ausstossung von zwei Molekeln p-Toluylsäure. Es entstehen die Fragmente m/e 217 und 81 ("base peak"). Auch der Zerfall der Toluylsäure



Formelschema 3: Zerfall der di-O-toluylierten Nucleoside 14 und 15 im Massenspektrometer.

4) Dieser Zerfall wird vom Uebergangssignal bei m/e 69,5 begleitet.
5) Dieser Zerfall wird vom Uebergangssignal bei m/e 46,5 begleitet.

(m/e 136) kann beobachtet werden; es entstehen die Fragmente m/e 119, 91, 65 und die Uebergangssignale m/e 69,5 und 46,5. Der Basenteil des Nucleosids stabilisiert sich durch schrittweise Aufnahme von zwei H-Atomen (m/e 95 und 96).

4.1.3. Konfiguration an C-1'

4.1.3.1. Die "Triplett-Quartett-Regel"

Die Konfiguration am anomeren C-Atom lässt sich bei 2'-Desoxynucleosiden mit Hilfe der NMR.-Spektren zuordnen. Lemieux [37] stellte fest, dass das Signal des Protons am C-1' bei β-Nucleosiden aus drei Linien, bei α-Nucleosiden aus deren vier besteht.

Das H-Atom an C-1' koppelt mit den beiden Protonen an C-2'. Je nachdem, ob die Base α- oder β-ständig angeordnet ist, nimmt die Desoxyribose eine andere Konformation ein; die von den Zuckerprotonen eingeschlossenen Diederwinkel ändern sich und damit nach Karplus [38] auch die Kopplungskonstanten (vgl. auch [39]).

Die Konformation der Desoxyribose ist nun beim β-Nucleosid gerade so [40], dass die Kopplungen des Protons an C-1' mit beiden C-2'-Protonen gleich gross sind; es resultiert ein Pseudotriplett mit "J"= 7 Hz [6], Signalbreite 14 Hz. Im Falle des α-Nucleosids sind die Kopplungen nicht mehr gleich, sie betragen etwa 3 und 7 Hz; die Signalbreite des entstandenen doppelten Dubletts ist dann etwa 10 Hz.

Sämtliche anomeren Paare von Desoxyribosiden, von denen die NMR.-Spektren vorliegen, zeigen die erwähnten Aufspaltungsmuster [41] [42] [43]. Die Protonen an C-2' und C-1' können

---

6) Angegeben sind die scheinbaren Kopplungskonstanten (= Linienabstände).

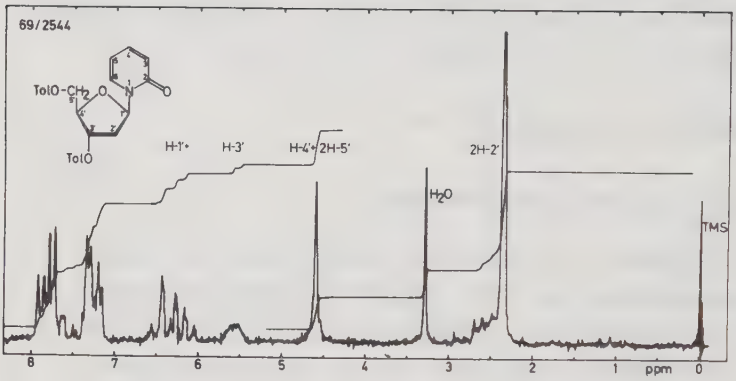


Fig. 3: 60 MHz - NMR.-Spektrum des β-Nucleosids 14 in $(CD_3)_2SO$[7].

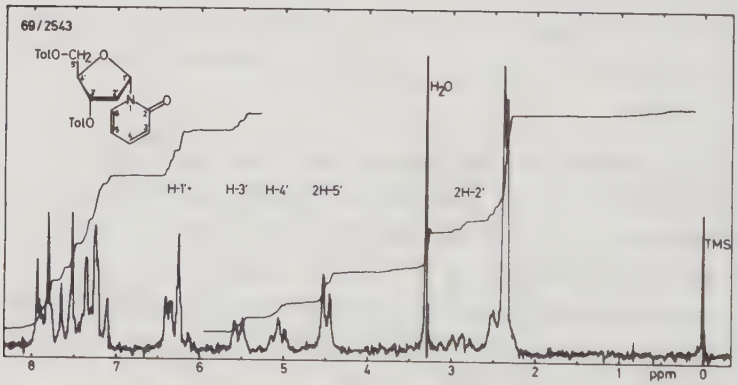


Fig. 4: 60 MHz - NMR.-Spektrum des α-Nucleosids 15 in $(CD_3)_2SO$.

---

7) In allen NMR.-Spektren sind die chemischen Verschiebungen in δ-Werten angegeben, bezogen auf δ = 0 für Tetramethylsilan.

als ABX-System betrachtet werden; Interpretationen solcher Aufspaltungsmuster nach den Regeln für Systeme erster Ordnung dürfen deshalb nur als grobe Näherungen betrachtet werden. Die Linienabstände im X-Teil (= Proton an C-1') entsprechen nicht den wahren Kopplungskonstanten J_{AX} und J_{BX}; hingegen ist die Signalbreite gleich der Summe der beiden Kopplungskonstanten. Die oben erwähnten Beispiele deuten ferner darauf hin, dass die Aufspaltung des dem anomeren Proton entsprechenden Signals nur unbedeutend von der Differenz der chemischen Verschiebungen der beiden H-Atome an C-2' abhängt.

Da alle bisher bekannten Beispiele die genannten Aufspaltungen zeigen, kann von einer eigentlichen "empirischen Triplett-Quartett-Regel" gesprochen werden, die bei der Konfigurationsbestimmung von Desoxynucleosiden wertvolle Hilfe leistet. Sie scheint unabhängig von der Natur der Base am C-1' zu gelten. Vorsicht ist bei der Anwendung dieses Konzepts aber immer dann geboten, wenn sich an der Base oder am Zucker grosse Substituenten befinden, welche die Konformation der Desoxyribose verändern könnten. Die Regel kann natürlich nur Geltung haben, solange die von Lemieux angenommene Konformation erhalten bleibt; dies scheint aber in den bisher beschriebenen Fällen zuzutreffen.

4.1.3.2. NMR.-Spektren der Nucleoside 14 und 15 in $(CD_3)_2SO$

In den NMR.-Spektren der di-O-toluylierten Nucleoside 14 und 15 in Dimethylsulfoxid-Lösung (vgl. Fig. 3 und 4) überdecken die Protonen an C-3 und C-5 des Pyridonringes das Signal des anomeren Protons, dessen Aufspaltung infolgedessen nicht beobachtet werden kann.

Trotzdem liess sich mit Hilfe dieser Spektren die Konfiguration bestimmen. Aus den von Lemieux und Hoffer [37] publizierten Spektren von anomeren, di-O-toluylierten Desoxyribosiden war ersichtlich, dass das Signal des H-Atoms an C-4' bei den β-Nucleosiden bei höherem Feld erscheint als bei den α-Nucleo-

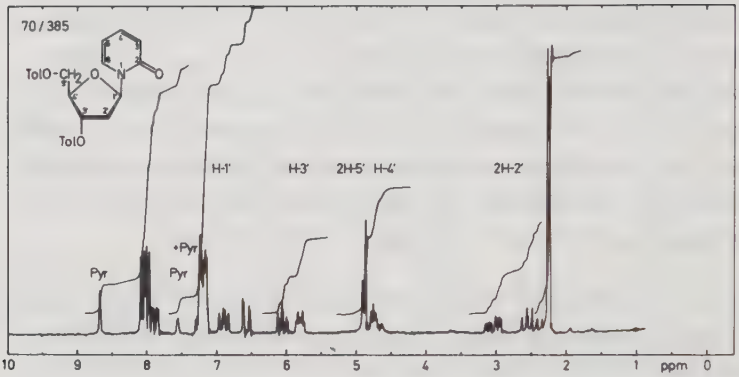


Fig. 5: 100 MHz - NMR.-Spektrum des β-Nucleosids 14 in C_5D_5N.

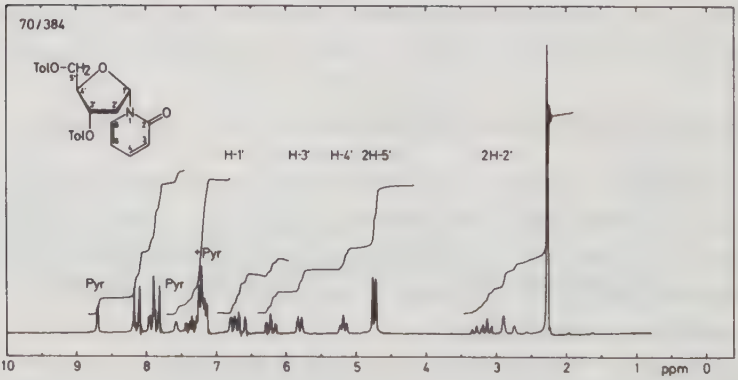


Fig. 6: 100 MHz - NMR.-Spektrum des α-Nucleosids 15 in C_5D_5N.

siden, und zwar so, dass es mit dem Signal der beiden H-Atome an C-5' praktisch zusammenfällt. Nach Nuhn et al. [44] wird allgemein das zum Substituent am C-1' cis-ständige Proton (α-Verbindung: H-Atom an C-4'; β-Verbindung: H-Atom an C-3') nach tieferem Feld verschoben.

Wir ordnen deshalb derjenigen Verbindung die β-Konfiguration zu, bei der das Signal bei 5,0 ppm fehlt, und die statt dessen bei 4,6 ppm ein Drei-Protonen-Signal aufweist.

4.1.3.3. NMR.-Spektren der Nucleoside 14 und 15 in C_5D_5N

Wir vermuteten, dass es möglich sein müsste, durch die Wechselwirkung des fast aromatischen Pyridonrestes mit einem aromatischen (und deshalb magnetisch anisotropen) Lösungsmittel die NMR.-Signale der Pyridonprotonen oder des H-Atoms an C-1' so zu verschieben, dass die Aufspaltung des Signals des anomeren Protons sichtbar würde. Wie die Figuren 5 und 6 zeigen, gelang dies in der Tat bei der Verwendung von Perdeutero-pyridin als Lösungsmittel.

Die anomeren Protonen beider Nucleoside ergaben ein doppeltes Dublett. Im Falle der α-Verbindung waren die Linienabstände 7 und 2 Hz[8]. Bei der β-Verbindung betrugen sie 6 und 8 Hz [8]; das aufgrund der "Triplett-Quartett-Regel" erwartete

---

8) Heller und Wagner, die vor kurzem auch über die Synthese der anomeren Desoxyriboside von 2-Pyridon berichteten [45], fanden Kopplungskonstanten von 6,6 und 2 Hz (α-Anomeres) bzw. 5,8 und 8,1 Hz (β-Anomeres) [46]. Die Spektren wurden in $CDCl_3$ aufgenommen; die Kopplungskonstanten entnahmen die Autoren dem AB-Teil des ABMX-Spektrums der H-Atome an C-2', C-3' und C-1', da das Signal des anomeren Protons verdeckt war.

Triplett war hier also nur beinahe entstanden. Auch beim di-O-toluylierten β-Thymidin sind die beiden "Kopplungskonstanten" nicht ganz gleich, wie Ryan et al. berichtet haben [47].

Diese beiden in Perdeutero-pyridin gemessenen NMR.-Spektren bestätigen die Zuordnung der Konfigurationen, die anhand der in Dimethylsulfoxid aufgenommenen Spektren getroffen wurde.

4.1.3.4. Die optischen Drehungen

Die Werte der optischen Drehungen, $[\alpha]_D^{24} = -132° \pm 2°$ für das α-Nucleosid 15 und $[\alpha]_D^{24} = +42° \pm 2°$ für das β-Anomere 14, zeigen, dass hier erneut eine Ausnahme der Hudson'schen Isorotationsregel vorliegt [48] [49]. Nach dieser Regel sollte in der D-Reihe das stärker positiv drehende Anomere die α-Konfiguration besitzen (vgl. auch [37] und [3], S. 340).

4.2. Die beiden freien Nucleoside 20 und 21

4.2.1. 1-(2'-Desoxy-α-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (20)

4.2.1.1. Entfernen der Toluylgruppen mit NH_3

Zur Abspaltung der Toluylgruppen wurde das di-O-toluylierte α-Nucleosid 15 in NH_3-gesättigtem Methanol 48 Stunden bei 23° stehengelassen [26]. Nach den Dünnschichtchromatogrammen trat während dieser Zeit ein Zwischenprodukt auf, das nach längerer Reaktionszeit wieder verschwand. Wir vermuten, dass die Methanolyse der Estergruppen schrittweise vor sich geht. Beim beobachteten Zwischenprodukt, das nicht isoliert und identifiziert wurde, dürfte es sich um das 3'-O-Monotoluylat des α-Nucleosids 20 handeln.

4.2.1.2. Entfernen der Toluylgruppen mit $NaOCH_3$

Die Schutzgruppen liessen sich auch durch kurzes Erhitzen des Diesters 15 in 0,1N methanolischer Natriummethylat-Lösung entfernen [22]. Nach Abtrennen des entstandenen Methyl-p-toluylates durch Verteilung zwischen Petroläther und Wasser, wurde das rohe Nucleosid an einer Kieselgelsäule chromatografiert und aus Aceton kristallisiert.

4.2.2. 1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (21)

Wie beim α-Nucleosid 15 konnten auch beim di-O-toluylierten β-Nucleosid 14 die Schutzgruppen durch kurzzeitiges Erhitzen in 0,1N Natriummethylatlösung entfernt werden. Das Rohprodukt wurde ebenfalls durch Chromatografie und Kristallisation gereinigt.

4.2.3. Konstitution der beiden freien Nucleoside 20 und 21

Die beiden anomeren Nucleoside 20 und 21 zeigten wie die Di-O-toluylderivate 14 und 15 fast gleiche IR.-, UV.- und Massenspektren. Sie unterschieden sich im NMR.-Spektrum, im Schmelzpunkt und in der spezifischen Drehung.

Die IR.- und UV.-Spektren wiesen immer noch auf eine N-glykosidische Verknüpfung zwischen der Desoxyribose und dem Pyridon hin. Im IR. war die Esterbande bei 1715 cm^{-1} verschwunden; dafür trat eine breite Schwingung bei ca. 3300 cm^{-1} auf, die den nun freien Hydroxylgruppen entsprach.

In den Massenspektren (vgl. Fig. 7 und 8) sind neben dem Molekel-Ion (m/e 211) die typischen Signale von Zuckerteil (m/e 117) und Basenteil zu sehen (vgl. Formelschema 4 und [36]). Dieser stabilisiert sich durch schrittweise Aufnahme von zwei H-Atomen (m/e 95 und 96). Das Ion m/e 95 (= Molekel-Ion von 2-Pyridon) zerfällt unter Eliminierung

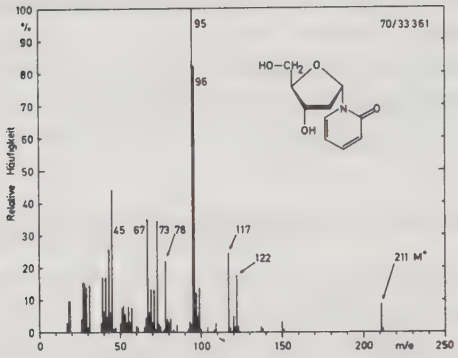


Fig. 7: Massenspektrum des α-Nucleosids 20.

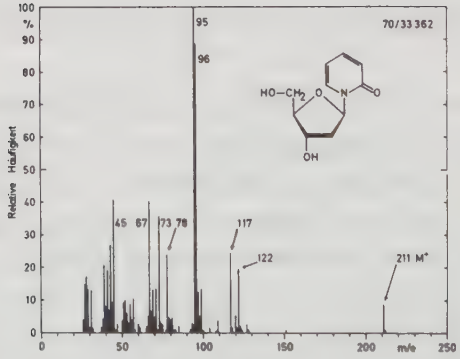
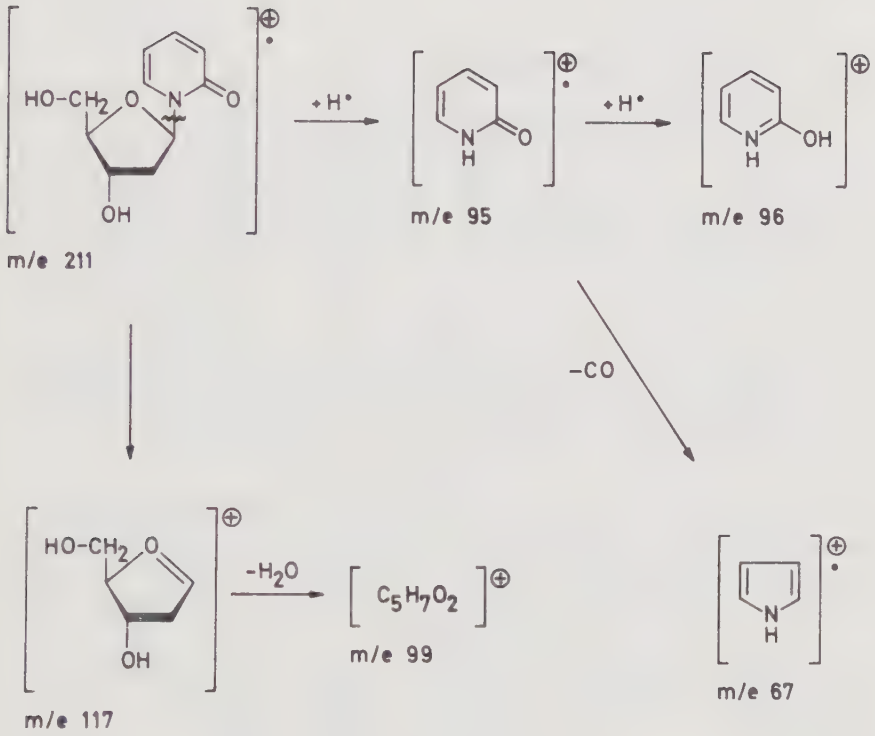


Fig. 8: Massenspektrum des β-Nucleosids 21.



Formelschema 4: Zerfall der freien Nucleoside 20 und 21 im Massenspektrometer.

von CO; es entsteht das Pyrrol-Ion m/e 67. Das Zuckerfragment zerfällt weiter unter Verlust von H_2O unter Bildung des Fragmentes m/e 99. Die für Nucleoside charakteristische Spitze M-89 bei m/e 122 konnte ebenfalls beobachtet werden [36] .

4.2.4. Konfiguration an C-1'

Da die freien Nucleoside aus den Di-O-toluylderivaten hergestellt wurden und deren Konfiguration eindeutig zugeordnet werden konnte, war auch diejenige der Nucleoside 20 und 21 sichergestellt. Die NMR.-Spektren bestätigen diese Zuordnung wie folgt.

Die Spektren wurden wiederum sowohl in Dimethylsulfoxid-d_6 (vgl. Fig. 9 und 10) wie auch in Pyridin-d_5 aufgenommen (vgl. Fig. 11 und 12). Wie erwartet, wurde das anomere Proton bei Verwendung von Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel durch die Signale zweier Pyridon-Protonen verdeckt. Dafür waren in diesen Spektren die beiden HO-Gruppen als scharfes Dublett bzw. Triplett zu sehen (mit D_2O austauschbar). Mit Deutero-Pyridin als Lösungsmittel wurden die Signale so gegeneinander verschoben, dass dasjenige des anomeren Protons deutlich sichtbar wurde. Die Aufspaltungen beim β- bzw. α-Nucleosid entsprachen vollständig der "Triplett-Quartett-Regel" (Triplett mit "J" = 6,5 Hz und doppeltes Dublett mit "J" = 7 und 3 Hz). Im weiteren konnte festgestellt werden, dass auch bei den freien Nucleosiden das H-Atom an C-4' im Falle des β-Nucleosids bei höherem Feld absorbiert als beim α-Anomeren.

Die optischen Drehungen, $[\alpha]_D^{24} = -100° \pm 2°$ für das α-Nucleosid 20 und $[\alpha]_D^{24} = +108° \pm 2°$ für das β-Nucleosid 21, zeigen, dass auch die freien Nucleoside Ausnahmen der Hudson'schen Isorotationsregel darstellen.

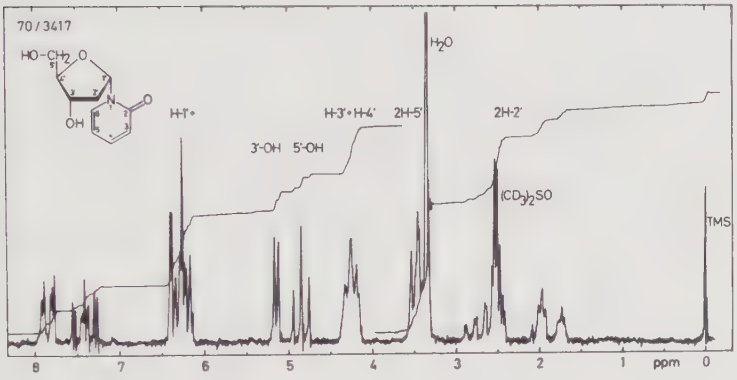


Fig. 9: 60 MHz - NMR.-Spektrum des α-Nucleosids 20 in $(CD_3)_2SO$.

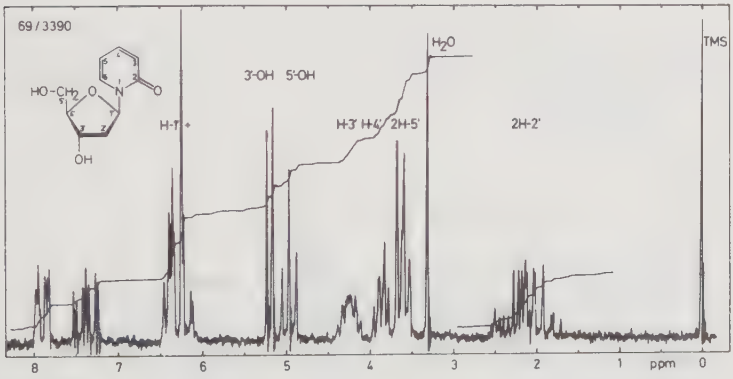


Fig. 10: 60 MHz - NMR.-Spektrum des β-Nucleosids 21 in $(CD_3)_2SO$.

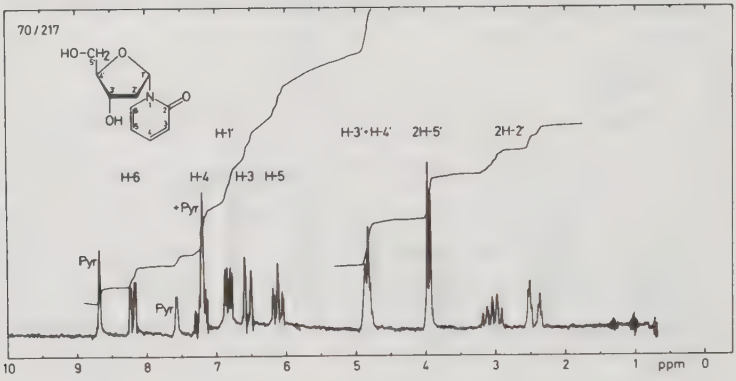


Fig. 11: 100 MHz - NMR.-Spektrum des α-Nucleosids 20 in C_5D_5N.

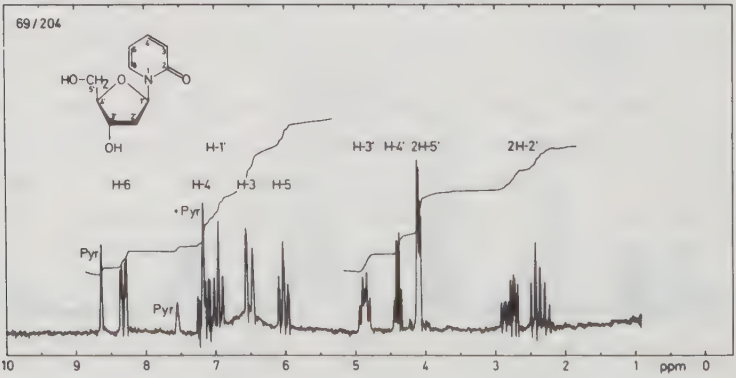


Fig. 12: 100 MHz - NMR.-Spektrum des β-Nucleosids 21 in C_5D_5N.

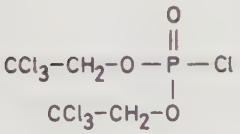
4.2.5. Biologische Aktivität

Mertes berichtete kürzlich ebenfalls über eine Synthese der beiden anomeren Desoxynucleoside des 2-Pyridons [50], welche die Produkte aber nur in sehr schlechter Ausbeute lieferte. Beide Verbindungen wurden auf ihre biologische Aktivität geprüft. Sie wirkten nicht als Inhibitoren der Thymidylat-Synthetase. Das Wachstum von Bacillus cereus wurde nicht beeinflusst; hingegen wurde das Wachstum von Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus gehemmt.

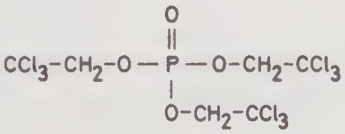
4.3. Das geschützte Nucleotid 22

4.3.1. Phosphorylierung des β-Nucleosids 21

Kürzlich führten Eckstein & Scheit das Phosphorsäure-bis-[2,2,2-trichloräthylester]-chlorid (23) als Phosphorylierungsmittel für Nucleoside ein [51].



23



24

Infolge der beiden raumfüllenden Trichloräthylgruppen lassen sich mit dieser Verbindung Nucleoside selektiv in 5'-Stellung phosphorylieren, ohne dass die 3'-Hydroxylgruppe geschützt zu werden braucht [52].

Wir setzten daher das freie β-Nucleosid 21 mit 23 in absolutem Pyridin um. Chromatografie der Produkte an Kieselgel ergab 35 % des gesuchten Nucleotids 22, das rechromatografiert wurde. Es resultierten 30 % dünnschichtchromatografisch

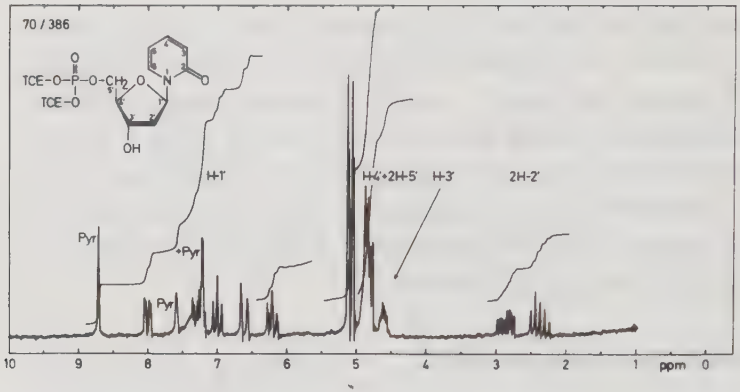


Fig. 13: 100 MHz - NMR.-Spektrum des Nucleotids 22 in C_5D_5N.

Tabelle 1: Chemische Verschiebungen der Protonen an C-3' und C-5'

	$(CD_3)_2SO$		C_5D_5N	
	H-3'	2H-5'	H-3'	2H-5'
2-Pyridon-β-nucleosid--3',5'-ditoluylat (14)	5,55	4,60	5,80	4,88
2-Pyridon-β-nucleosid (21)	4,26	3,62	4,87	4,10
2-Pyridon-β-nucleosid--5'-(bis-TCE-phosphat) (22)	4,12	4,37	4,61	4,83
Chemische Verschiebungen in ppm bezogen auf δ = 0 ppm für TMS				

reines 22 als farbloser Honig, der bisher nicht kristallisierte.

Bei der Verwendung von käuflichem 23 erhielten wir Phosphorsäure-tris-[trichloräthylester] (24) [53] als Nebenprodukt der Phosphorylierung. Es wurde noch nicht abgeklärt, ob dieser bereits dem Phosphorylierungsmittel beigemengt war oder erst während der Reaktion entstand.

Bei allen Phosphorylierungsversuchen wurden bei der Chromatografie des Rohprodukts jeweils grosse Mengen von sehr unpolaren Anteilen als braunes Oel erhalten. Sie dürften mehrere Nebenprodukte enthalten, die bisher nicht getrennt und isoliert wurden. Bei Verwendung eines eigenen Präparates von 23 (hergestellt in Analogie zur Vorschrift für die entsprechende Verbindung des Trifluoräthanols [51] [54]) schieden sich aus diesem Oel nach einiger Zeit Kristalle von 2-Pyridon ab.

4.3.2. Konstitution und Konfiguration

Im IR.-Spektrum war die Bande bei ca. 3300 cm^{-1} noch vorhanden (3'-OH), neu dazu kam die P=O-Absorption bei 1280 cm^{-1}. Das UV.-Spektrum entsprach dem eines N-substituierten 2-Pyridons.

Das Massenspektrum von 22 war wenig aufschlussreich. Zwischen m/e 400 und 500 waren verschiedene Signalgruppen, die Partikeln mit 8 und 9 Cl-Atomen entsprachen. Daraus muss geschlossen werden, dass sich die Verbindung unter den Messbedingungen stark zersetzt. Bei m/e 551 wurde eine sehr schwache Signalgruppe festgestellt, doch war es unter den beschriebenen Umständen fraglich, ob sie dem Molekel-Ion von 22 entsprach.

Die optische Drehung war mit $[\alpha]_D^{24} = + 51° \pm 3°$ immer noch stark positiv. Da aber das α-Anomere nicht vorlag, liess

sich keine gültige Aussage darüber machen, ob auch dieses Nucleotid von der Hudson'schen Regel abweicht.

Im NMR.-Spektrum (vgl. Fig. 13) waren die beiden Trichloräthylgruppen als zwei beinahe äquivalente Dublette zu sehen. Das 3'-Hydroxyl-Proton gab auch bei Verwendung von Dimethylsulfoxid-d_6 als Lösungsmittel kein scharfes Signal, war aber als breite Bande sichtbar und liess sich mit D_2O austauschen. Bei Aufnahme des Spektrums in Pyridin-d_5 war die Feinstruktur des dem anomeren Proton entsprechenden Signals als Triplett mit "J" = 6,5 Hz erkennbar, was wiederum die β-Konfiguration bestätigte.

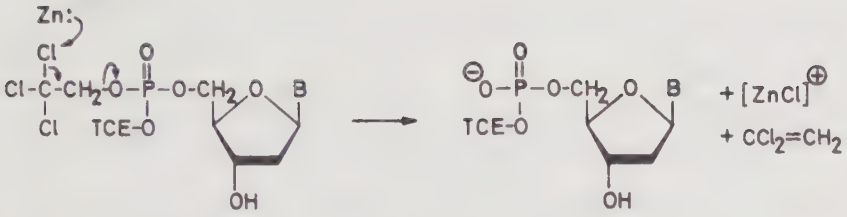
Aus dem NMR.-Spektrum war auch ersichtlich, dass die Phosphorylierung nicht etwa an der 3'-Hydroxylgruppe erfolgt war, sondern - wie auch aufgrund des gewählten Phosphorylierungsmittels erwartet wurde - an der 5'-Hydroxylgruppe. Die chemische Verschiebung (vgl.Tabelle 1) des 3'-Protons des Nucleotides 22 entsprach eher derjenigen im freien Nucleosid 21, die Verschiebung der 5'-Protonen dagegen eher derjenigen im di-O-toluylierten Nucleosid 14. Daraus schlossen wir, dass im Nucleotid 22 die Phosphorsäureester-Gruppe tatsächlich in 5'-Stellung war.

4.4. 2-Pyridon-β-nucleosid-5'-phosphat 25

4.4.1. Reduktion der Trichloräthylgruppen

Die Trichloräthylgruppen liessen sich durch Erhitzen des geschützten Nucleotides 22 mit Zinkstaub [55] in 90-proz. Pyridin entfernen [52].

Die Zn-Ionen wurden gegen $H^{\oplus}$-Ionen ausgetauscht, die entstandene Salzsäure mit Ag_2CO_3 entfernt und die Silberionen erneut gegen $H^{\oplus}$-Ionen ausgetauscht. Das rohe Nucleotid 25 wurde



dann mit Bariumhydroxid neutralisiert und als Ba-Salz aus Wasser-Methanol-Aceton gefällt. In weiteren Versuchen wurde das Nucleotid auch als Ammonium- und als Natriumsalz isoliert (siehe Exper. Teil).

4.4.2. Charakterisierung

Das UV.-Spektrum des Na-Salzes des Nucleotides glich dem von N-substituiertem 2-Pyridon.

Die Aufnahme eines NMR.-Spektrums erwies sich als sehr schwierig. Das Ba-Salz des Nucleotides war sehr schlecht löslich in $(CD_3)_2SO$. Das Spektrum war deshalb sehr schwach (siehe Fig. 14). Es bestätigte aber die Struktur. Ein Proton konnte mit D_2O ausgetauscht werden (3'-HO-Gruppe).

Vom Na-Salz wurde versucht, in C_5D_5N ein NMR.-Spektrum aufzunehmen. Auch hier war die Löslichkeit sehr schlecht. Es resultierte ein sehr schwaches Spektrum, bei dem jedoch bei 6,91 ppm ein dem anomeren Proton entsprechendes Triplett mit "J" = 6 Hz festgestellt werden konnte.

4.4.3. Konstitution, Abbau mit Schlangengift

Die Synthesemethode und die chemischen Verschiebungen der H-Atome an C-3' und C-5' in den NMR.-Spektren dienten beim geschützten Nucleotid 22 als Beweis dafür, dass es sich um ein Nucleosid-5'-phosphat handelte. Da das freie Nucleotid

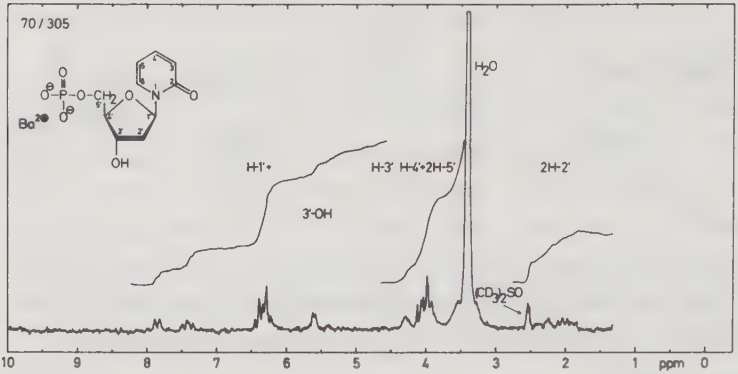


Fig. 14: 100 MHz - NMR.-Spektrum des Nucleotids 25 (Ba-Salz) in $(CD_3)_2SO$.

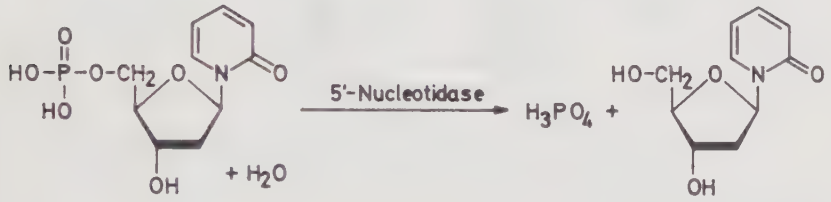
Tabelle 2: Enzymatischer Abbau von Nucleotiden mit 5'-Nucleotidase (rohes Gift von Crotalus adamanteus); die Abkürzungen entsprechen den IUPAC-IUB-Regeln [56].

Substrat		Produkt	
Thymidin-5'-phosphat	(pT_d)	Thymidin	(T_d)
Thymidin-3'-phosphat	(T_dp)	keine Reaktion	
Desoxyguanosin-5'-phosphat	(pG_d)	Desoxyguanosin	(G_d)
Adenosin-5'-phosphat	(pA)	Adenosin	(A)
Adenosin-3'-phosphat	(Ap)	keine Reaktion	
Adenosin-5'-diphosphat	(ppA)	Adenosin	(A)
Cytidin-5'-phosphat	(pC)	Cytidin	(C)
Cytidin-3'-phosphat	(Cp)	keine Reaktion	
2-Pyridon-β-nucleosid-5'-phosphat (25)		2-Pyridon-β-nucleosid (21)	

25 aus 22 hergestellt wurde, sind die oben genannten Beweise auch für 25 gültig.

Als letzten Konstitutionsbeweis führten wir noch einen Abbau des Nucleotids 25 mit Schlangengift durch.

Das Gift vieler Schlangen enthält - neben anderen Enzymen - eine 5'-Nucleotidase (= 5'-Ribonucleotid-Phosphohydrolase, E.C. 3.1.3.5 [57]), ein Enzym, das selektiv Nucleosid-5'-phosphate in die Nucleoside und anorganisches Phosphat zerlegt; Nucleosid-3'-phosphate werden nicht angegriffen.



25 21

Die Gifte von Crotalus atrox und Crotalus adamanteus sind für analytische Zwecke am besten geeignet, da die neben der 5'-Nucleotidase noch enthaltenen unspezifischen Phosphatasen etwa 1000 mal weniger aktiv sind [58] [59]. Diese Gifte können deshalb roh verwendet werden.

Für unsere Versuche verwendeten wir eine Suspension von lyophilisiertem Gift von Crotalus adamanteus in bidestilliertem Wasser. Obwohl in der Literatur genügend Hinweise zu finden waren, dass das Gift dieser Schlangenart 3'-Phosphate nicht angreift [58] [59] [60] [61], führten wir eine Reihe von Kontrollversuchen mit entsprechenden Substraten durch. Sie bestätigten die Spezifität des verwendeten Präparats, indem alle eingesetzten 3'-Phosphate keine Reaktion zeigten,

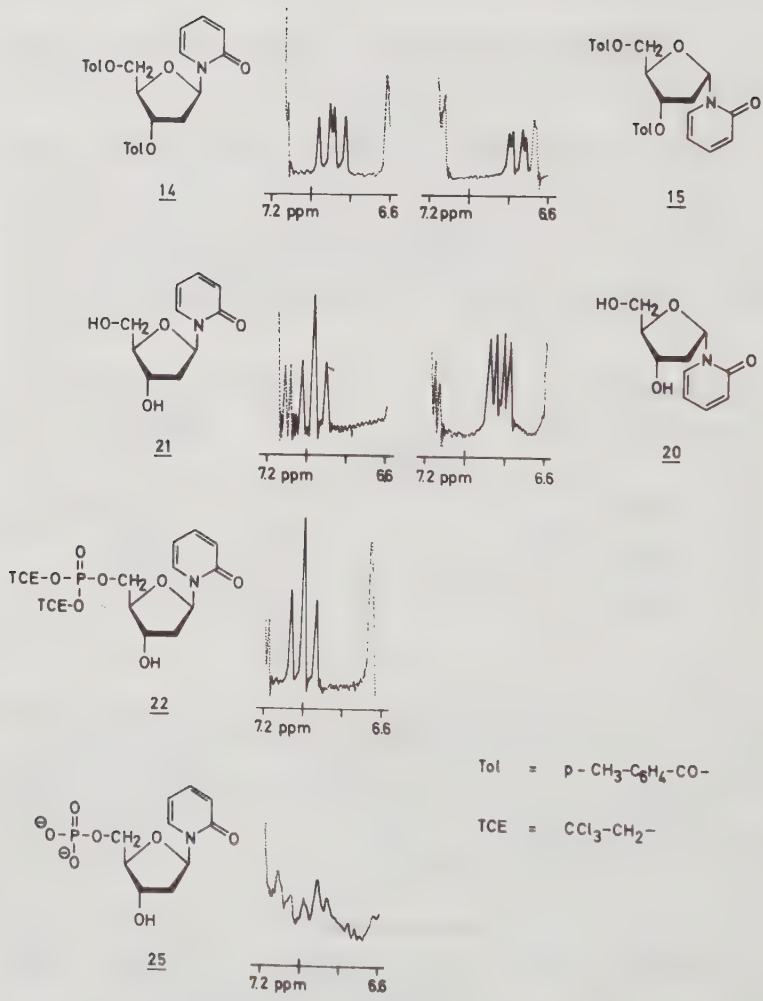


Fig. 15: Vergleich der NMR.-Spektren der verschiedenen Pyridon-Nucleosid-Derivate. Wiedergegeben sind die Signale der anomeren Protonen. Lösungsmittel: C_5D_5N.

während die 5'-Phosphate vollständig gespalten wurden (vgl. Tabelle 2). Das bei diesen Versuchen eingesetzte Thymidin-3'-phosphat wurde wie folgt erhalten: Das Bariumsalz von Thymidin-3'-(β-cyanoäthyl-phosphat) [$T_dp(CNEt)$] [9] wurde 15 Stunden bei 23° in konz. NH_3 stehengelassen.

Bei allen Abbauversuchen wurden die Produkte im Dünnschichtchromatogramm identifiziert.

Das Ammoniumsalz des Nucleotids 25 wurde unter den gleichen Bedingungen, unter denen die Kontrollversuche durchgeführt worden waren, durch das Schlangengift vollständig zum Nucleosid 21 hydrolysiert. Die Konstitution von 25 ist damit gesichert.

5. Bemerkungen zu den NMR.-Spektren der hergestellten Verbindungen

Zur Konfigurationsbestimmung von C-1' mit Hilfe der NMR.-Spektren kann, wie bereits erwähnt, die Aufspaltung des dem anomeren Proton entsprechenden Signals benützt werden. Diese ist aber erst erkennbar, wenn die Spektren der Pyridonnucleoside in Perdeuteropyridin aufgenommen werden. In anderen Lösungsmitteln, wie $(CD_3)_2SO$ (siehe oben), $CDCl_3$ [46] oder D_2O [50], ist dieses Signal ganz oder teilweise verdeckt.

Die Konformation der Desoxyribose in α- und β-Nucleosiden und deren Derivaten scheint in der Form, wie sie von Lemieux [40] angenommen worden ist, sehr stabil zu sein. Ein Vergleich der NMR.-Spektren aller im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen bestätigt diese Annahme (vgl.

---

9) Ich danke Herrn Werner Falk für die Ueberlassung einer Substanzprobe.

Fig. 15). Jede Verbiegung des Zuckerringes sollte eine Aenderung der Kopplungskonstanten zur Folge haben. Man stellt fest, dass die grosse Phosphorsäure-triester-gruppe in 5'-Stellung (Nucleotid 22) keinen Einfluss auf die Konformation des Zuckers hat (das anomere Proton erscheint als Triplett). Die aus dem im NMR.-Spektrum beobachteten doppelten Dublett abzuleitende Verbiegung der Ribose beim di-O-toluylierten β-Nucleosid 14 [10] scheint deshalb allein durch den Toluylester an C-3' hervorgerufen zu werden. Die Isolierung und Charakterisierung der zum 3'-O-Monotoluylat des α-Nucleosids (vgl. Abschnitt 4.2.1.1.) analogen β-Verbindung wäre in diesem Zusammenhang von grossem Interesse.

III. ANHANG. Versuche zur Festkörpersynthese ("Solid Phase Synthesis") von Oligonucleotiden

1. Allgemeines

1.1. Einleitung

Beim Aufbau von Kettenmolekülen wie Polypeptiden oder Oligonucleotiden wiederholt sich eine bestimmte Anzahl von Reaktionsschritten jeweils beim Anfügen einer neuen Einheit. Merrifield [62] und Shemyakin [63] entwickelten ein vereinfachtes Syntheseverfahren. Sie befestigen das erste Kettenglied an einem polymeren Festkörper. Nachher werden die verschiedenen Reaktionen ausgeführt ohne die wachsende Kette jedesmal zu isolieren. Dadurch, dass diese aber an einem

10) Beim ditoluylierten α-Nucleosid 15 dürfte die Konformation auch verändert sein, nur ist dies nicht so offensichtlich aus dem NMR.-Spektrum zu ersehen wie in der β-Reihe.

hochmolekularen Träger angehängt ist, lassen sich Operationen wie das Zugeben der Chemikalien für einen Reaktionsschritt und das Auswaschen überschüssiger Reagenzien sehr bequem durchführen. Zum Schluss, nach dem Anfügen der letzten Einheit und dem Entfernen der Schutzgruppen, wird die Verknüpfung zwischen dem Träger und der synthetisierten Kette gelöst und diese isoliert.

Es ist sofort ersichtlich, dass, sobald ein Reaktionsschritt nicht mit 100-prozentiger Ausbeute erfolgt, die Kettensequenz eine Fehlstelle erhält. Diese fehlerhaften Nebenprodukte können erst ganz am Schluss vom erwünschten Hauptprodukt abgetrennt werden, was meist ziemlich schwierig ist, da sich die verschiedenen Ketten nur sehr wenig voneinander unterscheiden. Eine analytische Kontrolle der Zwischenprodukte ist kaum möglich.

In der Peptidchemie waren bisher mit dieser neuen Methode einige Erfolge zu verzeichnen. Für die Synthese grosser natürlicher Peptide mit mehr als etwa 20 Aminosäuren dürfte die derzeit gebräuchliche Merrifield-Technik allerdings nicht sehr geeignet sein. Die Synthese eines Peptids mit 124 Aminosäuren, das zu 13 % die Aktivität des Enzyms Ribonuclease A besass [64], zeigte, dass die Produkte selbst nach aufwendiger Reinigung noch Gemische sind, welche den anerkannten Kriterien einer erfolgreichen Naturstoffsynthese nicht genügen.

Letsinger et al. haben vor einigen Jahren als erste Versuche unternommen, um auch Oligonucleotide nach diesem neuen Syntheseprinzip aufzubauen. Seither sind auch die ersten Erfahrungen weiterer Arbeitsgruppen publiziert worden [65]-[81].

Ueberblickt man alle diese Arbeiten, so stellt man fest, dass bis heute bei weitem noch kein ideales Verfahren gefunden worden ist. Die Ausbeuten, die unter Verwendung der verschiedensten Trägermaterialien erzielt worden sind, schwanken

von schlecht bis sehr gut. Die Meinungen verschiedener Forschergruppen über die Vor- und Nachteile einer Methode oder eines bestimmten Trägermaterials variieren sehr stark. Im folgenden werden die bisherigen Ergebnisse auf dem Gebiete der Nucleotidsynthese zusammengefasst und kritisch beleuchtet.

1.2. Die verschiedenen Trägermaterialien

1.2.1. Lösliche Träger

Verwendet man als Träger der wachsenden Nucleotidkette ein lösliches Polystyrol [67] [68] [73], so können sämtliche Reaktionen in homogener Phase ausgeführt werden. Allerdings bereitet die Uebertragung der klassischen Arbeitsmethoden Schwierigkeiten; oft müssen für gewisse Reaktionen neue Lösungsmittel oder Reagenzien gefunden werden, weil das Polystyrol in den üblichen Solventien nicht löslich ist. Nach jedem Teilschritt ist der lösliche Träger, an den die Nucleotidkette gebunden ist, auszufällen. Es muss hierauf filtriert oder zentrifugiert und überschüssiges Reagens ausgewaschen werden.

1.2.2. Unlösliche Träger

Bei der Verwendung von unlöslichen Trägermaterialien können sämtliche klassischen Arbeitsprinzipien, Reagenzien und Lösungsmittel verwendet werden. Das Waschen des Polymeren ist äusserst einfach, die Handhabung sehr bequem.

Es ist aber zu bedenken, dass alle Reaktionen nun in heterogener Phase ablaufen. Es können daraus geringere Ausbeuten resultieren. Ferner müssen die Reaktionszeiten wesentlich verlängert werden. In dieser Hinsicht findet man in der Literatur allerdings keine übereinstimmenden Resultate.

Als unlösliche Träger werden Copolymerisate von Styrol und Divinylbenzol verwendet. Je nach dem Vernetzungsgrad

(und damit der Quellfähigkeit) lassen sich drei Typen unterscheiden:

- schwach vernetzte Perlen mit 1 - 2 % Divinylbenzol, dem originalen "Merrifield-Polymeren" entsprechend [69]-[71],[77]-[80].
- stark vernetzte Perlen mit ca 6 % Divinylbenzol [76] [81].
- Popcornpolymere mit ca 0,2 % Divinylbenzol, die aber durch Kettenverschlaufungen wesentlich stärker vernetzt sind [11] [65] [66] [72] [74] [75] [77].

Auch hier sind über Vor- und Nachteile der einzelnen Typen widersprüchliche Angaben veröffentlicht worden.

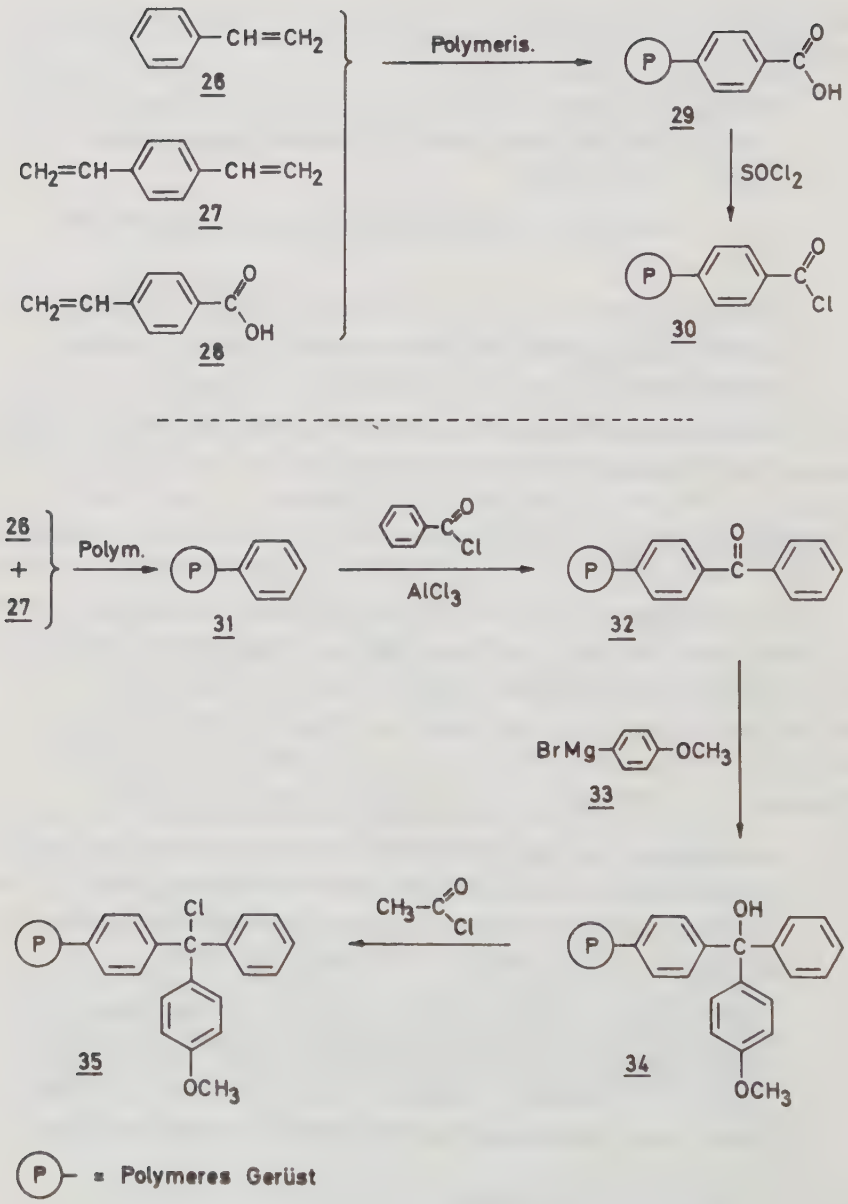
1.3. Die Verknüpfung zwischen dem ersten Nucleosid und dem Träger

Zur Verknüpfung des ersten Nucleosids oder Nucleotids mit dem Träger werden alle funktionellen Gruppen der Nucleoside herangezogen. Man geht so vor, dass die klassischen Schutzgruppen der Nucleotidchemie am Trägermaterial aufgebaut und dann mit der ersten Einheit zur Reaktion gebracht werden. Folgende Verknüpfungsarten sind bisher realisiert worden:

- Ein Gerüst mit Carbonsäurechloridgruppen dient der Veresterung der 3'- [72] oder 5'-Hydroxylgruppe [74] [75] [80] oder der Amidbildung mit der freien Aminogruppe der Base gewisser Nucleoside [65] [66].
- Durch Ätherbildung mit der 5'-Hydroxylgruppe lassen sich Nucleoside an Trägern befestigen, die Monomethoxy-tritylgruppen tragen [67] [68] [71] [73] [76] [78] [79].
- Ueber die 5'-Phosphorylgruppe können Nucleotide durch

---

11) siehe dazu z. B. [82].



Formelschema 5: Synthese der beiden Trägermaterialien.

eine Amidbindung mit Trägern verknüpft werden, die Aminogruppen tragen [69] [70].

- Polystyrol , das 2-(α-Pyridyl)-äthanol als funktionelle Gruppe enthält, kann mit der 5'-Phosphorylgruppe von Nucleotiden verestert werden [81].

2. Eigene Versuche

2.1. Allgemeines

Die Handhabung der löslichen Träger ist deutlich weniger einfach als diejenige der unlöslichen. Wir entschlossen uns daher, vorerst mit diesen Erfahrungen zu sammeln. Zur Zeit, als wir mit unseren Versuchen begannen, schien uns die geringere Quellbarkeit der Popcornpolymeren gegenüber den schwach vernetzten Perlen Vorteile zu haben; Versuche mit starren, hochvernetzten Perlpolymeren waren damals noch nicht bekannt.

Um genügend Spielraum bei den späteren Oligonucleotidsynthesen zu haben, schien es uns richtig, zwei Typen von Trägermaterialien herzustellen. Das eine sollte Carbonsäurechloridgruppen tragen; eine Nucleotidkette wäre dann mit Base abzuspalten. Daneben beabsichtigten wir noch, einen Träger mit Monomethoxy-tritylgruppen herzustellen; die Nucleotidketten könnten mit Säure davon entfernt werden.

2.2. Popcornpolymeres mit Carbonsäurechloridgruppen

Der Träger mit Säurechloridgruppen (30) wurde in Anlehnung an die Angaben von Letsinger [66] hergestellt durch Popcorn-Copolymerisation von Styrol (26), Divinylbenzol (27) und p-Vinylbenzoesäure (28). Durch Umsatz mit $SOCl_2$ wandelten wir die Carboxylgruppen von 29 in Säurechloridgruppen um (siehe Formelschema 5). Durch Methanolyse und Titration der freige-

setzten Chloridionen wurden 0,42 mVal funktionelle Gruppen pro Gramm Trägermaterial bestimmt.

2.3. Popcornpolymeres mit Monomethoxy-tritylgruppen

Sowohl lösliches Polystyrol [67] [68] [73] wie auch unlösliche Perlpolymere [71] [76] [78] [79] sind bisher mit Tritylgruppen versehen worden. Tritylgruppen an Popcornpolymeren sind jedoch nicht beschrieben worden.

Es sind zwei Methoden bekannt, um die Monomethoxy-tritylgruppe in ein Polymerengerüst einzufügen.

- Acylierung nach Friedel-Crafts mit Benzoylchlorid, dann Grignard-Reaktion mit p-Bromanisol. Das entstehende Carbinol wird mit Acetylchlorid zum entsprechenden Chlorid umgesetzt [76].
- Herstellung eines Copolymeren aus Styrol, Divinylbenzol und p-Jod-styrol. Dieses wird zuerst mit Butyl-Lithium und dann mit p-Methoxy-benzophenon umgesetzt. Das entstandene Carbinol wird wieder mit Acetylchlorid behandelt [71].

Wir wählten den ersten Syntheseweg (siehe Formelschema 5) und setzten Popcorn-polystyrol (31) mit Benzoylchlorid nach Friedel-Crafts um. Mit Hilfe der Oximierung mit Hydroxylamin versuchten wir, die Ketogruppen des gebildeten Benzophenonpolymeren 32 quantitativ zu erfassen [83]. Die erhaltenen Resultate waren aber unbefriedigend; sie ergaben - verglichen mit der Gewichtszunahme - zu kleine Werte. Wir vermuteten, dass das Polymerengerüst eventuell Reagenzien (z. B. $AlCl_3$ bzw. Al_2O_3 oder Wasser) zurückhält.

Es wurden hierauf zahlreiche Versuche unternommen, das Benzophenon-polymere 32 in einer Grignard-Reaktion mit p-Anisyl-magnesiumbromid 33 umzusetzen. Im IR.-Spektrum des Pro-

duktes, das der Formel 34 entsprechen sollte, konnte in keinem Falle eine HO-Bande festgestellt werden. Auch hatte die Intensität der C=O-Bande keineswegs abgenommen. Ein Versuch, mit p-Anisyl-Lithium einen Umsatz zu erreichen, ergab auch kein besseres Resultat.

Trotzdem wurde versucht, eine Probe des aus der Grignard-Reaktion stammenden Polymeren "34" mit Acetylchlorid umzusetzen. Das erhaltene Produkt sollte die Strukturformel 35 besitzen. Sein IR.-Spektrum war aber immer noch praktisch identisch mit dem des Benzophenon-polymeren 32.

Titration der Chloridionen nach der Methanolyse ergaben unwahrscheinlich hohe Werte. Mit 1,3 mVal/g lagen sie weit über dem in 32 bestimmten Gehalt an C=O-Gruppen (0,65 mMol/g)! Nach zweistündigem Auskochen in Benzol sanken die Titrationswerte auf 1,1 mVal/g.

Alle diese Ergebnisse deuteten wiederum auf Einschlüsse von Reagenzien im Polymerengerüst hin.

2.4. Schlussbemerkungen

Die Vermutung, das Gerüst halte Substanzen zurück, sowie das Erscheinen einer Publikation von Cramer [76] veranlassten uns, unsere Versuche einzustellen.

Cramer beschreibt in einer kurzen Mitteilung Versuche, aus denen hervorgeht, dass stark vernetzte Perlpolymere allen anderen Trägermaterialien überlegen sind, und zwar unter anderem deshalb, weil sie infolge ihrer äusserst geringen Quellung keine Substanzen festzuhalten vermögen. Im weiteren sind auch Popcornpolymere mit Tritylgruppen erwähnt; entsprechende experimentelle Einzelheiten sind aber bis heute nicht veröffentlicht worden.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. ALLGEMEINES

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze etwa $\pm$ 2°.

Substanzproben zur Elementaranalyse wurden - wo nicht anders angegeben - 16 Stunden bei 80°/0,02 Torr getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem Mikrolabor der Firma Sandoz A.G., Basel, (Dr. W. Schöniger) und dem mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (E. Thommen).

Die IR.-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-IR.-Gitterspektrometer, Modell 125, und die UV.-Spektren mit einem Beckman-UV.-Spektrophotometer, Modell DK 2, im Spektrallaboratorium des Instituts (K. Aegerter) aufgenommen.

Die 100 MHz - NMR.-Spektren wurden von H. Huber im physikalisch-chemischen Institut der Universität Basel mit einem Varian HA-100 D-Spektrometer gemessen, die 60 MHz - Spektren im Spektrallabor unseres Instituts (K. Aegerter) mit einem Varian A-60-Spektrometer.

Die Messung der Massenspektren besorgte freundlicherweise Dr. W. Vetter (F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel) mit einem MS-9-Gerät der Firma AEI, Manchester, bei 70 bzw. 12 eV.

Zum Bestimmen der optischen Drehungen wurde ein Perkin-Elmer-Polarimeter, Modell 141, benützt.

Zur Säulenchromatografie diente Kieselgel der Firma E. Merck A.G., Darmstadt (Korngrösse 0,05 - 0,20 mm).

Das Eindampfen von Lösungen erfolgte in einem Rotationsverdampfer bei 30 bis 40°/14 Torr.

Pyridin wurde zweimal über KOH destilliert und über Molekularsieb 4 Å (Union Carbide) aufbewahrt.

II. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. 2-Hydroxypyridin-quecksilber(II)-monochlorid (18)

Das nach Ukita et al. [26] erhaltene Rohprodukt wurde durch rasches, kräftiges Kochen in viel Wasser, Filtrieren der heissen Lösung und Kühlen in Eiswasser umkristallisiert: feine, fast farblose Blättchen vom Smp. 203 - 208° (Zers.).

Analyse:	$C_5H_4ClHgNO$	Ber. C 18,2	H 1,2	N 4,2 %
	(330,1)	Gef. C 17,9	H 1,6	N 4,2 %

Für die weiteren Umsetzungen wurde meist das Rohprodukt verwendet; der Einsatz der umkristallisierten Verbindung ergibt keine bessere Ausbeute.

2. 3,5-Di-O-p-toluyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid (19)

Das nach Hoffer [29] hergestellte Präparat kristallisierte in farblosen Nadeln vom Smp. 108 - 111°; $[\alpha]_D^{24}$ = + 61° ± 2° (c = 1,023 in Dimethylformamid). Ein aus einem anderen Versuch erhaltenes Präparat zeigte $[\alpha]_D^{24}$ = + 84° ± 2°. Die beiden anomeren Chloride dürften nicht jedes Mal im gleichen Verhältnis entstehen. Die gemessenen Werte stimmen auch nicht mit dem von Hoffer [29] überein ($[\alpha]_D^{25}$ = + 108°, c = 1 in Dimethylformamid).

Umkristallisation des Rohproduktes aus Toluol gelang nur mit schlechter Ausbeute und bewirkte keine Reinigung. Die Mutterlaugenrückstände enthielten jeweils grosse Mengen an Furfuryl-p-toluylat (17). Für die weiteren Reaktionen wurde daher das Rohprodukt verwendet.

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. eine starke Bande bei 1715 cm^{-1} (C=O; Ester).

NMR.-Spektrum (in $CDCl_3$): Multipletts bei 6,42 ppm (1H an C-1), 5,53 ppm (1H an C-3), 4,83 ppm (1H an C-4), 4,60 ppm (2H an C-5) und bei 2,73 ppm (2H an C-2), sowie die Signale der Toluylreste.

Analyse:	$C_{21}H_{21}ClO_5$	Ber. C 64,86	H 5,44	Cl 9,1 %
	(388,8)	Gef. C 65,5	H 5,5	Cl 8,6 %

3. Umsetzung von 3,5-Di-O-p-toluyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid (19) mit 2-Hydroxypyridin-quecksilber(II)-monochlorid (18)

3.1. Mit Zusatz von $HgBr_2$

564 mg (1,71 mMol) 2-Hydroxypyridin-quecksilber(II)-monochlorid (18) wurden in einem 100 ml-Kolben mit Magnetrührer, Rückflusskühler und Wasserabscheider in 60 ml trockenem Toluol aufgeschlämmt. Allfälliges restliches Wasser wurde durch Destillation von 15 ml Toluol über den Wasserabscheider entfernt. Nach Zugabe von 654 mg (1,68 mMol) 3,5-Di-O-p-toluyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid (19) trat nach 2 - 3 Minuten vollständige Lösung ein. Unter heftigem Rühren wurde 3 Stunden unter Rückfluss gekocht, dann mit 641 mg (1,78 mMol) $HgBr_2$ versetzt und weitere 4 Stunden gekocht. Nach Stehen über Nacht waren feine Nadeln auskristallisiert (wurden nicht weiter untersucht). Der ganze Kolbeninhalt wurde hierauf zur Entfernung aller Hg-Verbindungen mit 50 ml frisch bereiteter 30-proz. KJ-Lösung ausgeschüttelt und mit 10 ml Wasser gewaschen, die organische Phase mit K_2CO_3 getrocknet, filtriert und eingedampft. Es resultierten 577 mg eines farblosen Sirups, der an 60 g Kieselgel (Säule 2,6 x 21 cm) chromatografiert wurde. Eluiert wurde mit Methylenchlorid mit steigenden Mengen Methanol in Fraktionen zu je 50 ml.

Die Fraktionen 2 - 3 (eluiert mit reinem Methylenchlorid) ergaben 184 mg Furfuryl-p-toluylat (17). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Petroläther resultierten 95 mg farblose Prismen vom Smp. 49,5 - 51,5°.

Die Fraktionen 4 - 26 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(1000:0 bis 995:5)) ergaben 177 mg verunreinigtes Furfuryl-p-toluylat (17), das nicht weiter aufgearbeitet wurde.

Die Fraktionen 27 - 33 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(995:5)) ergaben 92 mg rohes β-Nucleosid 14 (12,3 % bezogen auf 19). Zweimaliges Umkristallisieren aus Äther-Petroläther ergab 60 mg (8 %) reines 1-(3',5'-Di-O-p-toluyl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (14) in fast farblosen Prismen vom Smp. 113,5 - 115,5°.

Die Fraktionen 34 - 43 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(995:5 bis 990:10)) ergaben 3 mg verunreinigtes β-Nucleosid 14, das nicht weiter aufgearbeitet wurde.

Die Fraktionen 44 - 51 (eluiert mit Methylenchlorid-Methanol-(990:10)) ergaben 74 mg rohes α-Nucleosid 15 (9,8 % bezogen auf 19). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äther, der ein wenig Methanol enthielt, resultierten 55 mg (7,3 %) reines 1-(3',5'-Di-O-p-toluyl-2'-desoxy-α-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (15) in filzigen Nadeln vom Smp. 157 - 158°.

3.2. Ohne Zusatz von $HgBr_2$

33 g (100 mMol) 2-Hydroxypyridin-quecksilber(II)-monochlorid (18) wurden in einem mit Magnetrührer, Rückflusskühler und Wasserabscheider versehenen Liter-Rundkolben in 400 ml trockenem Toluol aufgeschlämmt und durch Abdestillieren von 25 ml Toluol getrocknet. Das Reaktionsgemisch wurde dann bis knapp unter den Siedepunkt erhitzt. Während 30 Minuten wurden portionenweise total 23 g (60 mMol) 3,5-Di-O-p-toluyl-2-desoxy-

-D-ribofuranosylchlorid (19) zugegeben [12]. Anschliessend wurde noch während 60 Minuten am Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde der ganze Kolbeninhalt dreimal mit 250 ml frisch bereiteter 30-proz. KJ-Lösung extrahiert. Die KJ-Portionen wurden mit 200 ml Toluol gewaschen, das zur Hauptmenge gegeben wurde. Die vereinigten Toluolphasen wurden sodann noch zweimal mit 250 ml Wasser gewaschen, mit K_2CO_3 getrocknet, durch ein Faltenfilter filtriert und eingedampft.

Aus dem erhaltenen Sirup (28 g) konnten durch fraktionierte Kristallisation aus Tetrahydrofuran-Petroläther 3,8 g α-Nucleosid 15 und 1,7 g eines Gemisches der beiden anomeren Nucleoside erhalten werden. Der Rest des Rohproduktes wurde an 210 g Kieselgel (Säule 4 x 36 cm) chromatografiert. Die Elution erfolgte mit Methylenchlorid-Methanol-(960:4); Fraktionen zu 100 ml wurden aufgefangen. Das in den ersten Fraktionen eluierte Furfuryl-p-toluylat (7,6 g) wurde verworfen. Die Fraktionen, die verunreinigtes β-Nucleosid 14 enthielten, wurden vereinigt und rechromatografiert; analog wurde mit Gemischen der beiden Nucleoside 14 und 15 verfahren. Nach Umkristallisation aus Tetrahydrofuran-Petroläther resultierten 7,2 g (27 %) β-Nucleosid 14 und 5,5 g (21 %) α-Nucleosid 15.

3.3. Charakterisierung der Produkte

Furfuryl-p-toluylat (17)

Aus Petroläther farblose Prismen, Smp. 49,5 - 51,5°.

Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit einer Probe, die durch Verestern von Furfurylalkohol mit p-Toluylchlorid in absolutem Pyridin hergestellt worden war. Diese Probe hatte einen Smp. von 50 - 51°, der Mischsmp. der beiden Proben war 48,5 - 50,5°.

---

12) Die Halogenose wurde in einen Pulvertrichter geschüttet und möglichst rasch mit trockenem Toluol in den Kolben gespült.

Die NMR.-Spektren (in $(CD_3)_2SO$) der beiden Präparate waren identisch.

1-(3',5'-Di-O-p-toluyl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)--2(1H)-pyridon (14)
(2-Pyridon-β-nucleosid-3',5'-ditoluylat)

Aus Äther-Petroläther oder Tetrahydrofuran-Petroläther farblose Prismen vom Smp. 113,5 - 115,5° (Lit. [45]: 112-115°).

$[\alpha]_D^{24}$ = + 42,0° ± 2° (Lit. [45]: + 41,2°); $[\alpha]^{24}$ (λ) = + 45° (578 nm), + 54° (546 nm), + 138° (436 nm), + 451° (365 nm) (c = 1,320 in Methylenchlorid).

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 238,5 nm (ε = 34 750), 283 nm (4775) und 302 nm (5834) und Schulter bei 276 nm (4217).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 1725 cm^{-1} (C=O; Ester) und 1670 cm^{-1} (C=O des Pyridonringes).

60 MHz- NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2SO$ (vgl. Fig. 3): Multiplett bei 7,54 ppm (2H an C-4 und C-6 (Pyridonring), teilweise verdeckt durch die Signale der aromatischen Protonen der Toluylreste), Multiplett bei 6,30 ppm (3H an C-3, C-5 (Pyridonring) und C-1'), Multiplett bei 5,55 ppm (1H an C-3'), verbreitertes Singulett bei 4,60 ppm (3H an C-4' und C-5'), Multiplett bei 2,55 ppm (2H an C-2'), sowie die Signale der Toluylreste.

100 MHz - NMR.-Spektrum in C_5D_5N (vgl.Fig. 5): Dublett bei 7,88 ppm (1H an C-6), Multiplett bei 7,20 ppm (u.a. 1H an C-4), Doppeldublett bei 6,90 ppm (1H an C-1', J = 6 und 8 Hz), Dublett bei 6,58 ppm (1H an C-3),Triplett bei 6,06 ppm (1H an C-5), Multiplett bei 5,80 ppm (1H an C-3'), Dublett bei 4,88 ppm (2H an C-5'), Multiplett bei 4,75 ppm (1H an C-4'), Multiplett bei 3,04 ppm (1H an C-2'), Multiplett bei 2,58 ppm (1H an C-2'), sowie die Signale der Toluylreste.

Massenspektrum (vgl. Fig. 1): Molekel-Ion bei m/e 447.

Analyse: $C_{26}H_{25}NO_6$ (447,5) Ber. C 69,8 H 5,6 N 3,13 %
Gef. C 69,5 H 5,8 N 3,0/3,0 %

1-(3',5'-Di-O-p-toluyl-2'-desoxy-α-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (15)
(2-Pyridon-α-nucleosid-3',5'-ditoluylat)

Aus Äther oder Tetrahydrofuran-Petroläther farblose, filzige Nadeln vom Smp. 157 - 158° (Lit. [45]: 159°).

$[\alpha]_D^{24}$ =-132° ± 2° (Lit. [45]: - 134,5°); $[\alpha]^{24}(\lambda)$ = - 140° (578 nm), - 164° (546 nm), - 430° (436 nm), - 1360° (356 nm) (c = 0,914 in Chloroform).

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 238 nm (ε = 34 670), 283 nm (4875), 302,5 nm (5915) und Schulter bei 276 nm (4290).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 1720 cm^{-1} (C=O; Ester) und 1670 cm^{-1} (C=O des Pyridonringes).

60 MHz - NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2SO$ (vgl. Fig. 4): Multiplett bei 7,33 ppm (2H an C-4 und C-6 (Pyridonring), teilweise verdeckt durch die Signale der aromatischen Protonen der Toluylreste), Multiplett bei 6,30 ppm (3H an C-3, C-5 (Pyridonring) und C-1'), breites Dublett bei 5,54 ppm (1H an C-3'), breites Triplett bei 5,07 ppm (1H an C-4'), Dublett bei 4,50 ppm (2H an C-5'), Multiplett bei 2,90 ppm (1H an C-2'), Multiplett bei 2,50 ppm (1H an C-2', teilweise durch die Signale der Methylgruppen der Toluylreste verdeckt), sowie die Signale der Toluylreste.

100 MHz - NMR.-Spektrum in C_5D_5N (vgl. Fig. 6): Dublett bei 7,92 ppm (1H an C-6, teilweise verdeckt durch die Signale der aromatischen Protonen der Toluylreste), Multiplett bei 7,35 ppm (1H an C-4, teilweise verdeckt durch die Signale der

Toluylreste), Doppeldublett bei 6,77 ppm (1H an C-1', J = 7 und 2 Hz), Dublett bei 6,63 ppm (1H an C-3), Triplett bei 6,22 ppm (1H an C-5),Dublett bei 5,80 ppm (1H an C-3'), Triplett bei 5,18 ppm (1H an C-4'),Dublett bei 4,74 ppm (2H an C-5'), Multiplett bei 3,20 ppm (1H an C-2'), breites Dublett bei 2,82 ppm (1H an C-2'), sowie die Signale der Toluylreste.

Massenspektrum (vgl. Fig. 2): Molekel-Ion bei m/e 447.

Analyse: $C_{26}H_{25}NO_6$ (447,5) Ber. C 69,8 H 5,6 N 3,13 %
Gef. C 69,2 H 5,8 N 2,9/3,3 %

4. 1-(2'-Desoxy-α-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (20)
(2-Pyridon-α-nucleosid)

4.1. Entfernen der Schutzgruppen mit Na-Methylat

900 mg (2,01 mMol) 2-Pyridon-α-nucleosid-3',5'-ditoluylat (15) wurden in 45 ml 0,1N Na-Methylat-Lösung (in absolutem Methanol) gegeben. Nach 15 Minuten bei 23° war alles in Lösung gegangen. Anschliessend wurde noch 5 Minuten am Rückfluss gekocht. Ein Dünnschichtchromatogramm zeigte, dass kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden war.

Zur Neutralisation wurde die Reaktionslösung durch eine Ionenaustauschersäule laufen gelassen (1,3 x 12 cm, Amberlite IRC-50, $H^{\oplus}$-Form). Das Harz wurde mit 20 ml Methanol gespült und die erhaltene neutrale Lösung eingedampft. Es blieb ein gelblicher Honig zurück, der in Methylenchlorid, das 7 % Methanol enthielt, aufgenommen, mit 10 g Kieselgel versetzt und im Vakuum vollständig vom Lösungsmittel befreit wurde. Das entstandene Imprägnat wurde an einer Kieselgelsäule chromatografiert (4 x 44 cm, 250 g SiO_2). Eluiert wurde mit Methylenchlorid-Methanol-(93:7); Fraktionen zu 200 ml wurden aufgefangen. Es resultierten 330 mg (78 %) rohes 2-Pyridon-α-nucleosid 20 als farbloser Sirup. Dieses Rohprodukt wurde in

Methylenchlorid (enthaltend 7 % Methanol) gelöst und durch Zugabe von Cyclohexan zur Kristallisation gebracht: 250 mg (59 %) farblose Prismen vom Smp. 96 - 99°.

4.2. Entfernen der Schutzgruppen mit NH_3 in Methanol

1 g (2,24 mMol) 2-Pyridon-α-nucleosid-3',5'-ditoluylat (15) wurden in 50 ml mit Ammoniak gesättigtem absolutem Methanol aufgeschlämmt und bei 23° stehengelassen. Ueber Nacht hatte sich alles gelöst. Das Dünnschichtchromatogramm zeigte wenig freies α-Nucleosid 20, p-Toluylsäureamid, α-Nucleosid-3'-monotoluylat und Methyl-p-toluylat. (Es konnte nicht festgestellt werden, ob noch Ausgangsmaterial vorhanden war, da dieses den gleichen R_f-Wert wie Methyl-p-toluylat hatte). Nach 48 Stunden Reaktionszeit waren nur noch freies α-Nucleosid 20, p-Toluylsäureamid und Methyl-p-toluylat im Reaktionsgemisch feststellbar.

Es wurde eingedampft und der zurückbleibende Sirup mit 50 ml Wasser und 50 ml Petroläther aufgenommen und ausgeschüttelt. Die Wasserphase wurde noch zweimal mit Petroläther extrahiert. Die organischen Extrakte enthielten nur Methyl-p-toluylat und wurden daher verworfen.

Die Wasserphase wurde nun noch dreimal mit 50 ml Methylenchlorid und zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die organischen Extrakte wurden mit Wasser gewaschen und eingedampft. Es resultierten 120 mg kristallines p-Toluylsäureamid vom Smp. 158 - 159°. Eine Vergleichsprobe, hergestellt aus p-Toluylchlorid und konz. Ammoniak, zeigte nach Kristallisation aus Wasser-Äthanol einen Smp. von 157 - 158°. Die beiden Präparate waren nach IR.-Spektrum (KBr) identisch.

Die Wasserphase und die Waschwasser wurden vereinigt und ebenfalls eingedampft. Es resultierten 445 mg (94 %) rohes

α-Nucleosid 20. Umkristallisation aus Aceton ergab 330 mg (70 %) reines 20 vom Smp. 96 - 100° (Schmelzfluss trübe).

1-(2'-Desoxy-α-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (20)

Aus Aceton farblose Prismen vom Smp. 96 - 99° (Schmelzfluss trübe; Lit. [45]: 132°, [50]: 96 - 97,5°). $[\alpha]_D^{24}$ = -100° ± 2° (Lit. [45]: - 99,5°); $[\alpha]^{24}$ (λ) = - 107° (578 nm), - 129° (546 nm), - 309° (436 nm), - 831° (365 nm) (c = 0,97 in Wasser).

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 228 nm (ε = 6637) und 302 nm (5834).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3310 cm^{-1} (breit, OH) und 1655 cm^{-1} (C=O des Pyridonringes).

60 MHz - NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2SO$ (vgl. Fig. 9): Multiplett bei 7,85 ppm (1H an C-6), Multiplett bei 7,40 ppm (1H an C-4), Multiplett bei 6,25 (3H an C-3, C-5 und C-1'), Dublett bei 5,15 ppm* (OH an C-3', J = 3,5 Hz), Triplett bei 4,84 ppm* (OH an C-5', J = 6 Hz), Multiplett bei 4,25 ppm (2H an C-3' und C-4'), Dublett bei 3,48 ppm (2H an C-5'), Multiplett bei 2,73 ppm (1H an C-2') und Multiplett bei 1,87 ppm (1H an C-2'). * = mit D_2O austauschbare Protonen.

100 MHz - NMR.-Spektrum in C_5D_5N (vgl. Fig. 11): Dublett bei 8,20 ppm (1H an C-6), Multiplett bei 7,20 ppm (1H an C-4), Doppeldublett bei 6,83 ppm (1H an C-1', J = 7 und 3 Hz), breites Signal bei 6,8 ppm (OH an C-5' und OH an C-3'), Dublett bei 6,54 ppm (1H an C-3), Triplett bei 6,12 ppm (1H an C-5), Multiplett bei 4,83 ppm (2H an C-3' und C-4'), Dublett bei 3,96 ppm (2H an C-5'), Multiplett bei 3,05 ppm (1H an C-2') und breites Dublett bei 2,45 ppm (1H an C-2').

Massenspektrum (vgl. Fig. 7): Molekel-Ion bei m/e 211.

Analyse:	$C_{10}H_{13}NO_4$	Ber. C 56,86	H 6,20	N 6,63 %
	(211,2)	Gef. C 56,69	H 6,21	N 6,59 %

5. 1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (21)
(2-Pyridon-β-nucleosid)

3,0 g (6,7 mMol) 2-Pyridon-β-nucleosid-3',5'-ditoluylat 14 wurden in 150 ml einer 0,1N Lösung von Na-Methylat in absolutem Methanol aufgeschlämmt. Nach 10 Minuten bei 23° war sämtliches Material in Lösung gegangen; es wurde kurz aufgekocht und dann erkalten gelassen. Ein Dünnschichtchromatogramm zeigte, dass kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden war.

Die Reaktionslösung wurde zur Neutralisation durch eine Ionenaustauschersäule gelassen (1,6 x 12 cm, Amberlite IRC-50, $H^{\oplus}$-Form) und das Harz mit 50 ml Methanol gespült. Die Lösung wurde sodann auf etwa 20 ml eingeengt, mit 80 ml Wasser und 80 ml Petroläther aufgenommen und ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit zwei weiteren Portionen Wasser extrahiert, die ihrerseits zweimal mit Petroläther gewaschen wurden. Die Petroläther-Extrakte enthielten nur Methyl-p-toluylat und wurden verworfen. Die wässerigen Phasen wurden vereinigt und eingedampft. Es resultierten 1,5 g eines farblosen Sirups, der in Methylenchlorid (enthaltend 6 % Methanol) gelöst und durch Verdampfen des Lösungsmittels an 15 g Kieselgel adsorbiert wurde. Dieses Imprägnat wurde auf eine Kieselgelsäule gegeben (4 x 40 cm, 250 g SiO_2). Die Elution erfolgte mit Methylenchlorid-Methanol-(94:6); es wurden Fraktionen zu 250 ml aufgefangen. Auf diese Weise wurden 1185 mg (83 %) rohes β-Nucleosid 21 als farbloser Sirup erhalten, der mit der Zeit erstarrte. Umkristallisieren aus Aceton ergab 1092 mg (77 %) reines 21 vom Smp. 116 - 117,5°.

1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (21)

Aus Aceton farblose Prismen vom Smp. 116 - 117,5° (Lit. [45]: 115 - 116°, [50]: 115 - 116°). $[\alpha]_D^{24} = +108° \pm 2°$ (Lit. [45]: + 105,2°); $[\alpha]^{24}$ (λ) = + 113° (578 nm), + 132°

(546 nm), + 265°. (436 nm), + 579° (365 nm) (c = 1,35 in Wasser).

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 228 nm (ε = 6382) und 303 nm (6040).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3450 und 3190 cm^{-1} (breite Bande mit zwei Spitzen, OH) sowie bei 1650 cm^{-1} (C=O des Pyridonringes).

60 MHz - NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2SO$ (vgl.Fig. 10): Multiplett bei 7,90 ppm (1H an C-6), Multiplett bei 7,37 ppm (1H an C-4), Multiplett bei 6,28 ppm (3H an C-3, C-5 und C-1'), Dublett bei 5,22 ppm* (OH an C-3', J = 4 Hz), Triplett bei 4,97 ppm* (OH an C-5', J = 5,5 Hz), Multiplett bei 4,26 ppm (1H an C-3'), Multiplett bei 3,87 ppm (1H an C-4'), Multiplett bei 3,62 ppm (2H an C-5'), Multiplett bei 2,14 ppm (2H an C-2'). * = mit D_2O austauschbare Protonen.

100 MHz - NMR.-Spektrum in C_5D_5N (vgl. Fig. 12) : Dublett bei 8,32 ppm (1H an C-6), Multiplett bei 7,17 ppm (1H an C-4), Triplett bei 6,96 ppm (1H an C-1', J = 6,5 Hz), Dublett bei 6,51 ppm (1H an C-3), breites Signal bei 6,50 ppm (OH an C-3' und OH an C-5'), Triplett bei 6,03 ppm (1H an C-5), Multiplett bei 4,87 ppm (1H an C-3'), Quartett bei 4,40 ppm (1H an C-4'), Multiplett bei 4,10 ppm (2H an C-5'), Multiplett bei 2,80 ppm (1H an C-2'), Multiplett bei 2,37 ppm (1H an C-2').

Massenspektrum (vgl. Fig. 8): Molekel-Ion bei m/e 211.

Analyse: $C_{10}H_{13}NO_4$ (211,2) Ber. C 56,86 H 6,20 N 6,63 %
Gef. C 56,77 H 6,09 N 6,90 %

6. Phosphorsäure-bis-[2,2,2-trichloräthylester]-chlorid (23)

Das Phosphorylierungsmittel 23 wurde in Analogie zur Vorschrift für die entsprechende Verbindung des 2,2,2-Trifluor-

äthanols hergestellt [54] [51].

4,58 ml (7,66 g, 50 mMol) Phosphoroxychlorid wurden in 10 ml absolutem Äther gelöst. Unter Rühren und Eiskühlung wurde während 90 Minuten eine Lösung von 9,63 ml (14,94 g, 100 mMol) 2,2,2-Trichloräthanol (Fluka A.G., Buchs) und 8,1 ml (7,9 g, 100 mMol) absolutem Pyridin in 10 ml absolutem Äther zugetropft. Anschliessend wurde noch 90 Minuten lang bei 23° weitergerührt. Sodann wurden die leichtflüchtigen Anteile im Rotationsverdampfer entfernt und der zurückbleibende gelbe Sirup in einem Hickmannkolben bei 15 Torr fraktioniert. Das Säurechlorid 23 destillierte bei 79 - 82° und erstarrte zu einer farblosen, leicht schmierigen Masse vom Smp. 38 - 49° (Lit. [51]: 37 - 42°). Es wurde im Exsiccator über P_2O_5 aufbewahrt.

23 gibt mit alkoholischer Silbernitratlösung sofort eine flockige weisse Fällung von AgCl.

Seit kurzer Zeit ist Phosphorsäure-bis-[2,2,2-trichloräthylester]-chlorid (23) käuflich (Aldrich Inc., Milwaukee, Nr. 15537-3).

7. 1-[5'-O-(Bis-[2,2,2-trichloräthyl]-phosphoryl)-2'-desoxy--β-D-ribofuranosyl]-2(1H)-pyridon (22)

(2-Pyridon-β-nucleosid-5'-bis-[2,2,2-trichloräthyl]-phosphat)

481 mg (2,28 mMol) 2-Pyridon-β-nucleosid 21 wurden zum Entfernen von allfälligem Wasser dreimal in ca. 5 ml absolutem Pyridin aufgenommen, eingedampft und 15 Minuten am Hochvakuum bei 23° getrocknet. Dann wurde das Nucleosid in 10 ml absolutem Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit einer Lösung von 1,04 g (2,75 mMol) Phosphorsäure-bis-[2,2,2-trichloräthylester]-chlorid (23) (Aldrich) in 10 ml absolutem Pyridin versetzt. Nach 24-stündigem Stehen bei 4° wurde zur Trockne eingedampft, in 100 ml Chloroform aufgenommen und viermal mit 50 ml

Wasser extrahiert. Die wässerigen Phasen wurden jeweils zweimal mit Chloroform gewaschen und dann verworfen. Die vereinigten Chloroformphasen wurden eingedampft, in wenig Methylenchlorid, das 2,5 % Methanol enthielt, gelöst und auf eine Kieselgelsäule gebracht (4 x 42 cm, 250 g SiO_2). Eluiert wurde mit Methylenchlorid-Methanol-(975:25); es wurden Fraktionen von 200 ml aufgefangen.

Die Fraktionen 1 und 2 enthielten 8,2 mg gelbes Oel, das verworfen wurde.

Die Fraktion 3 ergab 82 mg gelbliche Kristalle. Aus Petroläther umkristallisiert resultierten 57,7 mg farblose, filzige Nadeln vom Smp. 71,5 - 73°. Dieser Schmelzpunkt, das UV.-Spektrum (keine Absorption) und die Elementaranalyse wiesen darauf hin, dass es sich um den von Gerrard [53] beschriebenen Phosphorsäure-tris-[2,2,2-trichloräthylester] (24) handeln musste.

Die Fraktionen 4 - 6 enthielten 345 mg eines braunen Sirups, der noch nicht weiter untersucht werden konnte. Bei einem weiteren Phosphorylierungsversuch, bei dem das nach 6. hergestellte Phosphorylierungsmittel verwendet wurde, schieden sich nach einiger Zeit aus diesem unpolaren Nebenprodukt Kristalle von 2-Pyridon ab.

Die Fraktionen 7 - 18 enthielten 46 mg farbloses Oel, das verworfen wurde.

Die Fraktionen 19 - 35 enthielten 444 mg (35 %) des gesuchten Nucleotids 22. Ein Dünnschichtchromatogramm zeigte, dass das Produkt noch nicht rein war.

Das Nucleotid wurde an 250 g SiO_2 (Säule 4 x 40 cm) rechromatografiert. Es wurde mit Methylenchlorid-Methanol-(97:3) eluiert; Fraktionen zu je 200 ml wurden gesammelt. Es

resultierten 376 mg (30 %) dünnschichtchromatografisch reines Nucleotid 22 als farbloser Sirup, der nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte, und der auch nach Lyophilisieren aus Benzol nicht fest wurde.

1-[5'-O-(Bis-[2,2,2-trichloräthyl]-phosphoryl)-2'-desoxy--β-D-ribofuranosyl]-2(1H)-pyridon (22)

Farbloser Sirup.

$[\alpha]_D^{24}$ = + 50,6° ± 3°; $[\alpha]^{24}$ (λ) = + 53° (578 nm), + 63° (546 nm), + 134° (436 nm), + 331° (365 nm) (c = 1,05 in Chloroform).

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 227 nm (ε = 5680) und 303 nm (5910).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3370 cm^{-1} (breit, OH), 1655 cm^{-1} (C=O, Pyridonring) und 1280 cm^{-1} (breit, P=O).

100 MHz - NMR.- Spektrum in $(CD_3)_2SO$: Dublett bei 7,68 ppm (1H an C-6), Multiplett bei 7,40 ppm (1H an C-4), Multiplett bei 6,32 ppm (3H an C-3, C-5 und C-1'), breites Signal bei 5,42 ppm* (OH an C-3'), Dublett bei 4,83 ppm (4H der Trichloräthylgruppen), Multiplett bei 4,37 ppm (3H an C-5' und C-4'), breites Singulett bei 4,12 ppm (1H an C-3'), Multiplett bei 2,35 ppm (1H an C-2') und Multiplett bei 2,03 ppm (1H an C-2'). * = mit D_2O austauschbares Proton.

100 MHz - NMR.-Spektrum in C_5D_5N (vgl. Fig. 13): Dublett bei 8,00 ppm (1H an C-6), breites Signal bei 7,30 ppm (OH an C-3'), Multiplett bei 7,25 ppm (1H an C-4), Triplett bei 7,00 ppm (1H an C-1' , J = 6,5 Hz), Dublett bei 6,61 ppm (1H an C-3), Multiplett bei 6,21 ppm (1H an C-5), Dublett bei 5,10 ppm (4H der Trichloräthylreste), Multiplett bei 4,83 ppm (3H an C-5' und C-4'), Multiplett bei 4,61 ppm (1H an C-3'), Multiplett

bei 2,86 ppm (1H an C-2') und Multiplett bei 2,36 ppm (1H an C-2').

Massenspektrum: Die Verbindung scheint bei der Arbeitstemperatur des Spektrometers nicht mehr stabil zu sein. Eine sehr schwache Signalgruppe bei m/e 551 könnte dem Molekel-Ion entsprechen.

Analyse: $C_{14}H_{16}Cl_6NO_7P$ (554,0) Ber. C 30,35 H 2,91 %
Gef. C 30,65 H 3,06 %

8. 1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (25)

(2-Pyridon-β-nucleosid-5'-phosphat)

8.1. Isolierung als Ba-Salz

30,9 mg (56 µMol) des Nucleotides 22 wurden in 3 ml 90-proz. Pyridin gelöst und mit 40 mg Zinkstaub während 7 Minuten bei 100 - 110° gerührt. Nach Zugabe von 0,3 ml Wasser und weiteren 30 mg Zink wurde noch 12 Minuten bei 100° gehalten. Danach wurde mit 10 ml Wasser verdünnt und ein Teil des Pyridins durch Einengen der Lösung auf etwa 5 ml entfernt. Die Lösung wurde dann durch Watte filtriert und auf eine Ionenaustauschersäule (1,6 x 6 cm, Merck I, $H^{\oplus}$-Form) gegeben. Es wurde solange mit Wasser eluiert, bis das Waschwasser neutral war. Die wässerige Lösung wurde etwas eingeengt und mit ca. 100 mg Ag_2CO_3 neutralisiert, daraufhin durch Watte filtriert und erneut durch einen Ionenaustauscher gelassen(1,6 x 6 cm, Merck I, $H^{\oplus}$-Form). Das Harz wurde mit Wasser gewaschen, das Eluat auf etwa 3 ml eingeengt und mit 0,05N $Ba(OH)_2$-Lösung auf pH 8 gestellt (Kontrolle mit Lyphan-Papier). Die Lösung wurde dann vollständig eingedampft und der resultierende Schaum (23,7 mg) in zwei Tropfen Wasser gelöst. Durch Zugabe von vier Tropfen abs. Methanol und 5 ml absolutem Aceton wurde das Ba-

Salz des Nucleotides 25 ausgefällt. Es wurde abzentrifugiert, im Zentrifugenglas zweimal mit absolutem Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Es resultierten 9 mg eines gelbbräunlichen Pulvers (38 %).

Smp.: Zersetzung ab etwa 250°, kein Smp. bis 300°.

100 MHz - NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2SO$ (vgl. Fig. 14): Es konnte nur ein schwaches Spektrum erhalten werden, da sich das Ba-Salz in $(CD_3)_2SO$ schlecht löst. Signale bei 7,83 ppm (1H an C-6), 7,42 ppm (1H an C-4), 6,30 ppm (3H an C-3, C-5 und C-1'), 5,60 ppm* (OH an C-3'), 4,30 ppm (1H an C-3'), 3,98 ppm (3H an C-4' und C-5'), 2,32 ppm (1H an C-2') und 1,98 ppm (1H an C-2'). * = mit D_2O austauschbares Proton.

8.2. Isolierung als Na-Salz

96,6 mg (174 µMol) des Nucleotides 22 wurden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 0,5 ml Wasser und 60 mg Zinkstaub versetzt und während 7 Minuten bei 110° gerührt. Dann wurde mit weiteren 0,5 ml Wasser und 80 mg Zink versetzt und noch während 10 Minuten bei derselben Temperatur weitergerührt. Die Lösung wurde dann durch Watte filtriert und auf eine Ionenaustauschersäule gegeben (1,6 x 12 cm, Merck I, $H^{\oplus}$-Form). Das Nucleotid wurde mit 30 ml Wasser eluiert. Zur Neutralisation wurde das Eluat mit 1,18 ml 0,5N NaOH-Lösung versetzt. Dann wurde zur Trockne eingedampft, in 10,0 ml Wasser aufgenommen, ein Aliquot von 0,1 ml zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen und die Lösung wieder eingedampft.

Es resultierte ein schmierig-kristalliner Rückstand, bestehend aus Nucleotid 25, NaCl und ev. Na_2CO_3. Ausbeute an

Nucleotid: 470 O.D. (304)-Einheiten [13] (80 µMol, 47 %).

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 225 nm und 304 nm; $\frac{\varepsilon\ (225)}{\varepsilon\ (304)} = 1{,}02$.

100 MHz - NMR.-Spektrum in C_5D_5N: Es konnte nur ein sehr schwaches Spektrum erhalten werden, da das Na-Salz sehr schlecht löslich war in Pyridin. Deutlich sichtbar war jedoch ein Triplett bei 6,91 ppm (1H an C-1', J = 6 Hz).

8.3. Isolierung als NH_4-Salz

72,4 mg (130 µMol) des Nucleotides 22 wurden in 4 ml Pyridin gelöst, mit 0,4 ml Wasser und 40 mg Zinkstaub versetzt und 8 Minuten bei 100° gerührt. Nach Zugabe von 0,4 ml Wasser und 60 mg Zink wurde weitere 10 Minuten bei 100° gehalten. Dann verdünnte man mit 10 ml Wasser, engte im Vakuum auf die Hälfte ein (zum Entfernen von Pyridin), filtrierte durch Watte und gab die Lösung auf eine Ionenaustauschersäule (1,6 x 6 cm, Merck I, $H^{\oplus}$-Form). Das Nucleotid wurde mit 40 ml Wasser eluiert. Das Eluat wurde mit konz. NH_3-Lösung basisch gestellt und zur Trockne eingedampft.

Es resultierte ein farbloser Lack, bestehend aus dem Ammoniumsalz des Nucleotides 25 und NH_4Cl. Er wurde in 10,0 ml bidest. Wasser gelöst. Diese Lösung diente zum Bestimmen der optischen Dichte und als Stammlösung für die enzymatischen Abbauversuche. Ausbeute an Nucleotid: 350 O.D.(304)-Einheiten (59 µMol, 45 %). Die Stammlösung enthält also 5,9 µMol bzw. 2,0 mg Nucleotid pro ml.

---

13) Die Anzahl der Optical Density-Einheiten ist das Produkt aus dem totalen Volumen der Lösung in ml und ihrer optischen Dichte (= Absorption), gemessen in einer 1 cm-Zelle bei der angegebenen Wellenlänge.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 225 nm und 304 nm; $\frac{\varepsilon\ (225)}{\varepsilon\ (304)} = 0{,}96$.

9. Enzymatischer Abbau des Nucleotides 25 mit rohem Gift von Crotalus adamanteus

9.1. Stammlösung des Enzyms

20 mg lyophilisiertes Gift der Diamantklapperschlange, Crotalus adamanteus, (F.G. Celo, Etzelweg 64, D-6660 Zweibrücken) wurde in 2,0 ml bidest. Wasser suspendiert, 4 Stunden bei ca. 3° stehengelassen und zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abpipettiert und mit 2,0 ml bidest. Wasser verdünnt. Diese Stammlösung enthielt 5 mg trockenes Schlangengift pro ml; sie wurde bei ca. 3° aufbewahrt.

9.2. Allgemeiner Ansatz

1 mg (ca. 3 µMol) Nucleotid wurde mit 0,1 ml 1 M Glycin-NaOH-Puffer (pH 8,6), 0,1 ml 0,1 M $MgCl_2$-Lösung und 0,1 ml Enzymlösung (entsprechend 0,5 mg Gift, siehe 9.1.) versetzt. Es wurde mit bidest. Wasser auf 1,0 ml aufgefüllt und 30 Minuten bei 37° inkubiert.

Zur Analyse wurden 10 µl dieser Lösung neben den entsprechenden Vergleichsproben auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und das Chromatogramm im Fliessmittel Isopropanol-Triäthylammoniumhydrogencarbonat oder Isopropanol-Ammoniak-Wasser entwickelt.

9.3. Abbau des 2-Pyridon-β-nucleosid-5'-phosphats (25)

0,7 ml der Nucleotid-Stammlösung (siehe 8.3.) wurden mit 0,1 ml 1 M Glycin-NaOH-Puffer (pH 8,6), 0,1 ml 0,1 M $MgCl_2$-Lösung und 0,1 ml Enzymlösung versetzt und während

30 Minuten bei 37° inkubiert. Die dünnschichtchromatografische Analyse erfolgte mit dem Fliessmittel Isopropanol-Triäthylammoniumhydrogencarbonat.

III. DUENNSCHICHTCHROMATOGRAFIE

Zur Dünnschichtchromatografie diente Kieselgel G nach Stahl der Firma E. Merck A.G., Darmstadt, (Korngrösse 10 - 40 µ), dem etwas Zinksilikat als Fluoreszenzindikator zugesetzt wurde.

Die Substanzflecke wurden sichtbar gemacht durch Betrachten im UV.-Licht, durch Einwirkung von Jod-Dämpfen oder durch Besprühen mit 10-proz. Perchlorsäure und Erwärmen auf etwa 150 - 200°

Tabelle 3: Zusammenstellung der Fliessmittel und R_f-Werte (Mittelwerte).

SUBSTANZ	Methylenchlorid-Methanol-(95:5)	Methylenchlorid-Methanol-(9:1)	Benzol-Tetrahydrofuran-(8:2)	Isopropanol-0,5 M Triäthylammoniumhydrogencarbonat-(9:2)	Isopropanol-konz. Ammoniak-Wasser-(70:7:23)
2-Pyridon-α-nucleosid-3',5'-ditoluylat (15)	0,50		0,30		
2-Pyridon-β-nucleosid-3',5'-ditoluylat (14)	0,65		0,37		
Furfuryl-p-toluylat (17)	0,75		0,71		
2-Pyridon-α-nucleosid (20)		0,18	0,04		
2-Pyridon-β-nucleosid (21)		0,22		0,64	0,71
p-Toluylsäureamid		0,50			
Methyl-p-toluylat		0,91	0,71		
2-Pyridon-α-nucleosid-3'-toluylat		0,54			
2-Pyridon-β-nucleosid-3'-toluylat		0,62			
2-Pyridon-β-nucleosid-5'-bis-[2,2,2-trichloräthyl]-phosphat (22)		0,60		0,65	0,79
2-Pyridon-β-nucleosid-5'-phosphat (25)		0,0		0,48	0,30 (Zers.)

IV. ANHANG: Herstellung eines Popcornpolymeren mit Monomethoxytritylgruppen

1. Styrol-Divinylbenzol-Popcornpolymeres (31)

60,6 g (580 mMol) frisch destilliertes (50°/26 Torr) Styrol (26), 0,5 ml einer ca. 50-proz. Lösung von Divinylbenzol (27) in Äthylvinylbenzol (entspr. 0,227 g reinem 27, 1,7 mMol) sowie ein Körnchen eines Popcornpolymerisates als Impfling wurden in einen Liter-Erlenmeyer-Kolben gebracht. Dieser wurde mit Stickstoff gespült, mit einem Silikonstopfen verschlossen und in ein Wasserbad von 65° gebracht. Nach 24 Stunden war die Polymerisation beendet. Das Produkt füllte den Kolben etwa zur Hälfte. Das schwammartige, trockene Material wurde in einem Mixer zerkleinert.

Man erhielt 58 g weisses Griess (Vernetzungsgrad: 0,3 Mol-% bzw. 0,38 Gew.-% Divinylbenzol).

IR.-Spektrum (fest in KBr): praktisch identisch mit dem Spektrum der Polystyrol-Eichfolie.

2. Benzophenon-Polymeres (32)

25 g Styrolpolymeres 31 (241 mMol aromatische Ringe) wurden in einem 200 ml Sulfierkolben mit Rührer, Tropftrichter und Rückflusskühler in 120 ml trockenem Nitrobenzol aufgeschlämmt. Dann wurden 12 g (90 mMol) pulverisiertes $AlCl_3$ zugegeben. Die Reaktionsmischung verfärbte sich in der Folge über gelb nach orange und erwärmte sich leicht. Während 30 Minuten wurden 11,1 g (85 mMol) Benzoylchlorid in 10 ml Nitrobenzol zugetropft. Man liess 40 Minuten bei 23°, erhitzte dann während 2 Stunden auf 90 - 100° und rührte nachher wieder bei 23° weitere 16 Stunden. Das Polymere quoll während dem Erhitzen etwa auf das doppelte Volumen, und es mussten noch 30 ml Lösungsmittel zugegeben werden.

Die ganze Mischung wurde dann zur Hydrolyse auf 700 ml Eiswasser gegossen. Man rührte sehr kräftig, damit sich die beiden Flüssigkeitsschichten intensiv vermischten. Die wässerige Phase wurde zweimal abdekantiert und durch 200 ml destilliertes Wasser ersetzt. Dann wurde das Polymere zweimal auf ähnliche Weise mit Aceton gewaschen. Schliesslich wurde abgenutscht und auf der Nutsche mit Aceton gewaschen. Um allfällig eingeschlossenes Lösungsmittel zu entfernen, kochte man das Produkt unter Rühren während 90 Minuten in 300 ml Alkohol am Rückfluss, liess dann über Nacht stehen (der Alkohol war leicht sauer geworden), nutschte ab und wusch auf der Nutsche gründlich mit Alkohol, Aceton und Pentan. Das Produkt 32 (30,7 g gelbliche Körnchen) wurde im Vakuumexsiccator über KOH/P_2O_5 getrocknet.

Aufgrund der Gewichtszunahme errechnete sich der Gehalt an C=O-Gruppen zu 1,46 mMol/g; die Titration (siehe weiter unten) ergab aber nur 0,65 mMol/g.

IR.-Spektrum (fest in KBr): Banden bei 1660 cm^{-1} (C=O), 1280 cm^{-1} und 1315 cm^{-1}.

Bestimmung des Gehaltes an C=O-Gruppen im Benzophenon-Polymeren 32

Zwei Proben von 32 (je ca. 0,8 g) wurden mit 50 ml frisch hergestellter Hydroxylaminlösung (siehe [83]) versetzt und gleichzeitig mit einer Blindprobe (50 ml Hydroxylaminlösung ohne Polymeres) während 46 Stunden am Rückfluss gekocht. Nachdem die Lösungen wieder erkaltet waren, wurden sie bis zum Umschlag des Indikators mit 0,1N HCl titriert. Von den Titrationswerten der Analysenproben wurde derjenige der Blindprobe subtrahiert. Auf diese Weise erhielt man für den Carbonylgehalt von 32 die Werte 0,652 und 0,656 mMol/g.

3. Methoxytrityl-carbinol-Polymeres (34)

In einem 100 ml-Kolben mit Magnetrührer, Tropftrichter und Rückflusskühler wurden 1,1 g (45 mMol) Magnesiumspäne in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran aufgeschlämmt und mit einem Jodkristall versetzt. Dann liess man etwas Bromanisol zutropfen und erhitzte bis die Reaktion einsetzte. Sobald die spontane Reaktion aufgehört hatte, gab man den Rest des Bromanisols zu (insgesamt 8,4 g entspr. 45 mMol) und kochte während einer Stunde am Rückfluss. Ein Test mit Michler's Keton [84] zeigte aktives Grignard-Reagens an. Man gab dann während drei Stunden aus einer Pulverdosiervorrichtung 4 g Benzophenon-Polymeres 32 zu (C=O-Gehalt dieser Probe war nicht bestimmt worden). Nach 1, 2, 2,5 und 3 Stunden wurde mit einem Tropfen der Reaktionsmischung der Test mit Michler's Keton ausgeführt; das Resultat war jedesmal positiv. Die Reaktionsmischung wurde dann während 21 Stunden am Rückfluss gekocht. Tests mit Michler's Keton nach 4, 5, 8 und 21 Stunden zeigten jedesmal, dass noch aktives Grignard- Reagens vorhanden war. Die Körner des Polymeren wurden während des Rührens zu einem feinen Pulver zerschlagen.

Zur Hydrolyse wurden 25 ml 6N HCl zugetropft. Es bildeten sich zwei flüssige Phasen aus. Es wurde noch 30 Minuten gerührt und dann soviel Äthanol zugesetzt, dass sich die Phasen mischten. Dann wurde abgenutscht und das Produkt mit Alkohol und Petroläther gewaschen. Nach dem Trocknen resultierten 4,91 g eines feinen, hellbräunlichen Pulvers.

IR.-Spektrum (fest in Nujol): Die Intensität der C=O-Bande hatte nicht abgenommen; eine OH-Bande bei etwa 3500 cm^{-1} war nicht festzustellen.

4. Methoxytrityl-chlorid-Polymeres (35)

2 g des Produktes der Grignard-Reaktion wurden in 25 ml absolutem Benzol mit 1,5 ml Acetylchlorid unter heftigem Rühren am Rückfluss gekocht. Während den ersten zwei Stunden war eine starke HCl-Entwicklung festzustellen. Nach 23 Stunden wurde das Produkt abgenutscht, mit Benzol und Petroläther gewaschen, dann zwei Stunden in Benzol am Rückfluss ausgekocht, um möglichst alles Acetylchlorid zu entfernen. Nachher wurde das Produkt abgesaugt, mit Benzol und Petroläther gewaschen und getrocknet. Es resultierten 1,9 g eines gelben Pulvers.

IR.-Spektrum (fest in Nujol): Das Spektrum war immer noch praktisch identisch mit dem des Benzophenon-Polymeren 32.

Ermittlung des Gehaltes an Chlorid: Zwei Proben des Polymeren "35" von je ca. 0,3 g wurden mit 1 ml 2$\underline{\underline{N}}$ NaOH in 30 ml Methanol zwei Stunden am Rückfluss gekocht. Dann wurde abgenutscht, mit Methanol und Wasser gewaschen, dann das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Methanol befreit, mit 2 ml 2$\underline{\underline{N}}$ HNO_3 angesäuert und mit einer Spatelspitze $CaCO_3$ neutralisiert. Es wurde dann 1 ml 0,1 $\underline{\underline{M}}$ K_2CrO_4-Lösung zugesetzt und mit 0,05$\underline{\underline{N}}$ $AgNO_3$-Lösung titriert. (Als Farbvergleich und Blindprobe diente dest. Wasser, dem die gleiche Menge Chromatlösung und Calciumcarbonat zugesetzt wurde). Die erhaltenen Werte waren 1,30 und 1,27 mVal/g. Nach zweistündigem Auskochen in Benzol und anschliessendem Waschen mit Benzol und Petroläther wurden die Titrationswerte 1,12 und 1,08 mVal/g erhalten.

C. ZUSAMMENFASSUNG

Oligonucleotide, welche, verglichen mit natürlichen Nucleinsäuren, eine Fehlstelle enthalten, sind wertvolle Hilfsmittel zur Erforschung der Proteinbiosynthese. Als Fehlstelle kann z. B. ein Nucleotid dienen, dessen Base nicht mehr fähig ist, Basenpaarung einzugehen. Aufgabe dieser Arbeit war es nun, eine solche Verbindung herzustellen, die dann später in eine Oligodesoxynucleotid-Kette eingebaut werden könnte.

Als Base wählten wir 2(1H)-Pyridon (5); dieser Verbindung fehlen die funktionellen Gruppen, die zur Ausbildung komplementärer Basenpaare nötig sind. Es galt also, das Desoxyribonucleotid 1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (25) zu synthetisieren.

2-Hydroxypyridin-quecksilber(II)-monochlorid (18) wurde mit 3,5-Di-O-p-toluyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid (19) nach dem Quecksilberverfahren umgesetzt. Es resultierten die beiden anomeren di-O-toluylierten Nucleoside 14 und 15 sowie Furfuryl-p-toluylat (17), das Zersetzungsprodukt der Halogenose 19. Die Konfiguration der Nucleoside 14 und 15 wurde mit Hilfe der NMR.-Spektren ermittelt. Die Toluylester wurden sodann mit Natriummethylat in Methanol entfernt; man erhielt die freien Nucleoside 20 und 21. Ihre NMR.-Spektren bestätigten die Zuordnung der Konfigurationen, wie sie bei den di-O-toluylierten Nucleosiden getroffen worden war. Die optischen Drehungen der geschützten wie auch der freien Nucleoside zeigen, dass diese Verbindungen Ausnahmen von Hudson's Isorotationsregel darstellen.

Zur Phosphorylierung des β-Nucleosides 21 wurde Phosphorsäure-bis-[2,2,2-trichloräthylester]-chlorid (23) verwendet,

ein Reagens, das bei Nucleosiden selektiv die 5'-Hydroxylgruppe phosphoryliert; die 3'-Hydroxylgruppe braucht deshalb nicht geschützt zu werden. Das erhaltene geschützte Nucleotid 22 lag als farbloser Honig vor, der nicht kristallisierte. Die chemischen Verschiebungen der Protonen an C-3' und C-5' zeigten, dass die Phosphorylierung tatsächlich an der 5'-Hydroxylgruppe erfolgt war.

Die Trichloräthylgruppen des Nucleotids 22 wurden reduktiv mit Zink in wässerigem Pyridin entfernt. Das freie Nucleotid 25 wurde, nachdem die Zinkionen gegen $H^{\oplus}$-Ionen ausgetauscht worden waren, mit Bariumhydroxid neutralisiert und aus Aceton gefällt. Die Struktur von 25 wurde durch einen enzymatischen Abbau des Ammoniumsalzes des Nucleotids mit 5'-Nucleotidase aus dem Gift von Crotalus adamanteus bestätigt: Es erfolgte vollständige Hydrolyse zum Nucleosid 21.

Der Anhang gibt einen Ueberblick über die von verschiedenen Arbeitsgruppen bis heute veröffentlichten Erfahrungen auf dem Gebiet der Festkörpersynthese von Oligonucleotiden. Im weiteren sind eigene Versuche erwähnt, die zu einem Trägermaterial für solche Synthesen führen sollten. Es wurde versucht, an einem Styrol-Divinylbenzol-Popcornpolymeren die Monomethoxy--tritylgruppe aufzubauen, was aber nicht gelang. Es wird vermutet, dass das Polymerengerüst Reagenzien zurückhält, die bei weiteren Umsetzungen störend wirken.

D. LITERATURVERZEICHNIS

[1] F. Cramer, Angew. Chem. 78, 186 (1966).

[2] H. G. Khorana, Pure and Appl. Chem. 17, 349 (1968).

[3] J. J. Fox & I. Wempen, Advan. Carboh. Chem. 14, 283 (1959).

[4] J. A. Montgomery & H. J. Thomas, Advan. Carboh. Chem. 17, 301 (1962).

[5] T. Ueda & J. J. Fox, Advan. Carboh. Chem. 22, 307 (1967).

[6] M. Hoffer, R. Duschinsky, J. J. Fox & N. Yung, J. Amer. Chem. Soc. 81, 4112 (1959).

[7] T. Y. Shen, Angew. Chem. 82, 730 (1970).

[8] A. Holý & F. Šorm, Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 34, 3523 (1969).

[9] F. Cramer, Accounts Chem. Res. 2, 338 (1969).

[10] H. Pischel & A. Holý, Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 34, 89 (1969).

[11] Tabelle "Properties of the Nucleic Acid Derivatives". Calbiochem, Los Angeles 1964.

[12] A. Albert & D. J. Brown, J. Chem. Soc. 1954, 2060.

[13] A. Albert & J. N. Phillips, J. Chem. Soc. 1956, 1294.

[14] W. W. Zorbach, Synthesis 1970, 329.

[15] G. Schramm, H. Grötsch & W. Pollmann, Angew. Chem. 74, 53 (1962).

[16] M. J. Robins, W. A. Bowles & R. K. Robins, J. Amer. Chem. Soc. 86, 1251 (1964).

[17] C. Pedersen & H. G. Fletcher, J. Amer. Chem. Soc. 82, 5210 (1960).

[18] J. Pliml & M. Prystaš, Advan. Heterocycl. Chem. 8, 115 (1967).

[19] G.E. Hilbert & T. B. Johnson, J. Amer. Chem. Soc. 52, 4489 (1930).

[20] M. W. Winkley & R. K. Robins, J. Org. Chem. 33, 2822 (1968).

[21] E. Fischer & B. Helferich, Ber. deutsch. chem. Ges. 47, 210 (1914).

[22] H. Pischel & G. Wagner, Arch. Pharmaz. 300, 602 (1967).

[23] H. Ley & H. Specker, Ber. deutsch. chem. Ges. 72, 192 (1939).

[24] W. Hückel, "Theoretische Grundlagen der organischen Chemie" Bd. I, 8. Aufl., Akadem. Verlagsges., Leipzig 1956, siehe Seite 287.

[25] J. J. Fox, N.Yung, J. Davoll & G. B. Brown, J. Amer. Chem. Soc. 78, 2117 (1956).

[26] T. Ukita, R. Funakoshi & Y. Hirose, Chem. Pharm. Bull. 12, 828 (1964).

[27] J. Davoll & B. A. Lowy, J. Amer. Chem. Soc. 73, 1650 (1951).

[28] G.Wagner & H. Pischel, Arch. Pharmaz. 295, 373 (1962).

[29] M. Hoffer, Chem. Ber. 93, 2777 (1960).

[30] G. Wagner, Z. Chem. 6, 367 (1966).

[31] G. Wagner & H. Pischel, Arch. Pharmaz. 296, 699 (1963).

[32] D. Heller & G. Wagner, Z. Chem. 10, 114 (1970).

[33] M. Prystaš, J. Farkaš & F. Šorm, Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 28, 3140 (1963).

[34] M. Prystaš & F. Šorm, Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 30, 1900 (1965).

[35] H. Specker & H. Gawrosch, Ber. deutsch. chem. Ges. 75, 1338 (1942).

[36] K. Biemann, "Mass Spectrometry (Organic Chemical Applications)", McGraw-Hill Book Company, New York/SanFrancisco/ Toronto/London 1962, siehe Seite 351.

[37] R. U. Lemieux & M. Hoffer, Canad. J. Chem. 39, 110 (1961).

[38] M. Karplus, J.Chem. Phys. 30, 11 (1959).

[39] M. Karplus, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2870 (1963); S. Sternhell, Quart. Revs. 23, 236 (1969); L. M. Jackman & S. Sternhell, "Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry", Pergamon Press, Oxford/London/Edinburgh/New York/Toronto/Sydney/Paris/ Braunschweig, 2nd Edit. 1969.

[40] R. U. Lemieux, Canad. J. Chem. 39, 116 (1961).

[41] M. J. Robins & R. K. Robins, J. Amer. Chem. Soc. 87, 4934 (1965).

[42] M. J. Robins & R. K. Robins, J. Org. Chem. 34, 2160 (1969).

[43] M. J. Robins, T. A. Khwaja & R. K. Robins, J. Org. Chem. 35, 636 (1970).

[44] P. Nuhn, A. Zschunke, D. Heller & G. Wagner, Pharmazie 24, 237 (1969).

[45] D. Heller & G. Wagner, Z. Chem. 8, 415 (1968).

[46] P. Nuhn, A. Zschunke, D. Heller & G. Wagner, Tetrah. 25, 2139 (1969).

[47] K. J. Ryan, E. M. Acton & L. Goodman, J. Org. Chem. 31, 1181 (1966).

[48] C. S. Hudson, J. Amer. Chem. Soc. 31, 66 (1909).

[49] C. S. Hudson, Advan. Carboh. Chem. 3, 1 (1948), siehe Seite 15.

[50] M. P. Mertes, J. Med. Chem. 13, 149 (1970).

[51] F. Eckstein & K. H. Scheit, Angew.Chem. 79, 317 (1967).

[52] A. Franke, K. H. Scheit & F. Eckstein, Chem. Ber. 101, 2998 (1968).

[53] W. Gerrard, W. J. Green & R. J. Phillips, J. Chem. Soc. 1954, 1148.

[54] K. Sasse in "Methoden der organischen Chemie" (Houben-Weyl), Organische Phosphorverbindungen, Teil 2, Verlag Thieme, Stuttgart 1964, siehe Seite 276.

[55] F. Eckstein, Chem. Ber. 100, 2228 (1967).

[56] IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1055 (1970).

[57] Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, Pergamon Press, Oxford/London/New York/Paris 1961, siehe Seite 105.

[58] G. M. Richards, G. du Vair & M. Laskowski, Biochemistry 4, 501 (1965).

[59] L. A. Heppel & R. J. Hilmoe, J. Biol. Chem. 188, 665 (1951).

[60] A. M. Michelson & A. R. Todd, J. Chem. Soc. 1953, 951.

[61] H. Schmitz, R. B. Hurlbert & V. R. Potter, J. Biol. Chem. 209, 41 (1954).

[62] R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963); R. B. Merrifield, Science 150, 178 (1965); R.B, Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 86, 304 (1964).

[63] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin & I. V. Khozhevnikova, Tetrah. Letters 1965, 2323.

[64] B.Gutte & R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 91, 501 (1969).

[65] R. L. Letsinger & V. Mahadevan, J. Amer. Chem. Soc. 87, 3526 (1965).

[66] R. L. Letsinger & V. Mahadevan, J. Amer. Chem. Soc. 88, 5319 (1966).

[67] H. Hayatsu & H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 88, 3182 (1966).

[68] F. Cramer, R. Helbig, H. Hettler, K. H. Scheit & H. Seliger, Angew. Chem. 78, 640 (1966).

[69] G. M. Blackburn, M. J. Brown & M. R. Harris, Chem. Commun. 1966, 611.

[70] G. M. Blackburn, M. J. Brown & M. R. Harris, J. Chem. Soc. (C) 1967, 2438.

[71] L. R. Melby & D. R. Strobach, J. Amer. Chem. Soc. 89, 450 (1967).

[72] R. L. Letsinger, M. H. Caruthers & D. M. Jerina, Biochemistry 6, 1379 (1967).

[73] H. Hayatsu & H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 89, 3880 (1967).

[74] R. L. Letsinger, M. H. Caruthers, P. S. Miller & K. K. Ogilvie, J. Amer. Chem. Soc. 89, 7146 (1967).

[75] T. Shimidzu & R. L. Letsinger, J. Org. Chem. 33, 708 (1968).

[76] F. Cramer & H. Köster, Angew. Chem. 80, 488 (1968).

[77] G. M. Blackburn, M. J. Brown, M. R. Harris & D. Shire, J. Chem. Soc. (C) 1969, 676.

[78] L. R. Melby & D. R. Strobach, J. Org. Chem. 34, 421 (1969).

[79] L. R. Melby & D. R. Strobach, J. Org. Chem. 34, 427 (1969).

[80] T. Kusama & H. Hayatsu, Chem. Pharm. Bull. 18, 319 (1970).

[81] W. Freist & F. Cramer, Angew. Chem. 82, 358 (1970).

[82] J. W. Breitenbach, Chimia 21, 449 (1967); J. W. Breitenbach & H. Dworak, Mh. Chem. 96, 1878 (1965).

[83] H. Roth et al. in "Methoden der organischen Chemie" (Houben-Weyl), Analytische Methoden, Verlag Thieme, Stuttgart 1953, siehe Seite 461.

[84] A. I. Vogel, "Practical Organic Chemistry", Longmans, Green and Co. Ltd., London 1962, siehe Seite 241.

E. CURRICULUM VITAE

Am 18. März 1943 wurde ich, Urs Marcel Séquin, in Winterthur als zweiter Sohn des Carlo Séquin, dipl. ing. ETH von Thun, und seiner Frau Margrit, geb. Schaeppi, Mittellehrerin, geboren. Im Januar 1947 zogen wir nach Basel, wo ich von 1950 - 54 die Primarschule und von 1954 - 62 das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium besuchte.

Im Frühling 1962 bestand ich die Matura und begann dann sofort mit dem Chemiestudium an der Universität Basel. Im Sommer des gleichen Jahres arbeitete ich während drei Monaten im analytischen Labor von Wilton Works ICI, Middlesbrough (Yorkshire, GB). Im Frühjahr 1963 bestand ich das 1. Vordiplomexamen, das zweite legte ich - mit dem Wahlfach Mineralogie - im Frühling 1965 ab. Das Diplom für Chemie erwarb ich im Herbst 1966. Anschliessend folgte ein dreimonatiges Volontariat im TAP-Betriebslabor der CIBA Aktiengesellschaft, Basel.

Im Juni 1967 begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Ch. Tamm mit der Ausarbeitung meiner Doktorarbeit "Die Synthese von 1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)--pyridon".

Im November 1969 wurde ich Basler Bürger. Im folgenden Frühling heiratete ich Regine Elmiger, Primarlehrerin von Basel.

Während zwei Jahren hat mir die Schweizerische Gesellschaft für Chemische Industrie ein Doktorandenstipendium gewährt, wofür ich ihr herzlich danke.

Seit Oktober 1970 bin ich als Assistent von Prof. Ch. Tamm angestellt.

Während meines Studiums leistete ich ca. 560 Tage Militärdienst. Ich bekleide den Grad eines Leutnants der Artillerie.

Folgenden Herren Professoren und Dozenten verdanke ich meine Ausbildung:

P. Baertschi, H. Balli, E. Baumgartner, P. Bearth, M. Brenner, K. Bucher, P. Buchner, H. Erlenmeyer †, S. Fallab, J. Gantner, F.Gerson, C. Grob, E. Heilbronner, P. Hemmerich, P. Huber, P. Leepin, E. Miescher, R. Müller †, B. Prijs, T. Reichstein, P.Scherrer †, P. Schiess, M. Staehelin, Ch. Tamm, M. Thürkauf, E. Wenk, R. Wizinger.